

BEST AVAILABLE COPY



REC'D 22 JAN 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 56 669.0

Anmeldetag: 04. Dezember 2002

Anmelder/Inhaber: Universitätsklinikum Charité an der
Humboldt-Universität zu Berlin,
Berlin/DE

Bezeichnung: Gemisch mindestens zweier Fusionsproteine
sowie ihre Herstellung und Verwendung

IPC: C 12 Q 1/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 09. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

Holß

Gemisch mindestens zweier Fusionsproteine sowie ihre Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Proteingemisch, enthaltend mindestens ein erstes Fusionsprotein, enthaltend ein Protein oder Proteinfragment, eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in ein Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, und mindestens ein zweites Fusionsprotein, enthaltend ein Protein oder Proteinfragment, eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

Die Phagendisplay-Technologie wird heutzutage in vielen Bereichen der Biotechnologie zum Auffinden von Proteinen mit gewünschten Bindungseigenschaften und enzymatischen Aktivitäten verwendet (Forrer, P. et al. (1999) Current Opinion in Struct. Biol. 9:514-520 und Gao, C. et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:12612-12616). Gleichmaßen wird die Technologie verwendet, um beispielsweise die Bindungseigenschaften, die enzymatischen Eigenschaften und/oder die thermodynamische Stabilität von bereits bekannten oder durch die Phagendisplay-Technologie isolierten Proteine zu verbessern (Forrer, P. et al. (1999) siehe oben). Die Grundlage für die Phagendisplay-Technologie liegt in der Beobachtung, daß bestimmte sogenannte nicht-lytische Bakteriophagen Bakterien lediglich infizieren und die Phagenpartikel nicht etwa durch Lyse des Bakteriums freisetzen, sondern die einzelnen Bestandteile des Bakteriophagens durch das Zytoplasma ins Periplasma und letztendlich auf die Bakterienzelloberfläche transportieren, wo dann der komplette Phage assembliert wird, der sich anschließend von der Bakterienzelle löst. Die Fusion eines interessierenden Proteins mit einem Phagenhüllprotein führt daher zum Export dieses Proteins aus dem bakteriellen Zytoplasma und der Präsentation auf der Oberfläche des Bakteriums. Für die Präsentation geeignete Phagenhüllproteine sind beispielsweise die aus dem M13-Phagemid stammenden pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX (Gao, C. et al. (2002) siehe oben).

Der N-Terminus des Phagenhüllproteins ist nach außen gerichtet, so daß das fusionierte Protein N-terminal vom Phagenhüllprotein angeordnet sein muß, damit es auf der Phagenoberflä-

che präsentiert wird. Dies führt zu keinem Problem, wenn einzelne bereits bekannte Proteine mit einem der genannten Phagenhüllproteinen fusioniert werden sollen, da für diese Proteine START- und STOP-Codons bekannt sind. Es führt jedoch dann zu Problemen, wenn eine sogenannte Phagen-Bibliothek hergestellt werden soll, bei der die Phagenhüllproteine mit einer cDNA-Bibliothek fusioniert werden sollen. Das Problem liegt darin, daß die in cDNA-Bibliotheken enthaltenden kodierenden Nukleinsäuren in der Regel translationelle STOP-Codons am 3'-Ende enthalten da durch die Poly(A⁺)-Selektion der mRNA und durch das anschließende Oligo-(dT)-priming die resultierenden cDNAs immer die translationellen STOP-Codons enthalten. So liegt bei Fusion einer Oligo-(dT)-geprimten cDNA 5' vom Phagenhüllprotein immer ein STOP-Codon zwischen der cDNA und dem Phagenhüllprotein, wodurch wiederum die Expression eines Fusionsproteins aus dem cDNA kodierten Protein und dem Phagenhüllprotein verhindert wird. Daher wurde von Cramer, R. und Suter, M. (1993) *Gene* 137:69-75 ein neuartiges Klonierungs- und Expressionssystem entwickelt, das darauf basiert, daß die Interaktionsdomänen der beiden Oncoproteine cJun und cFos, die über ein Proteinmotiv von gleichmäßig beabstandeten Leuzinresten dem sogenannten „Leuzin-Zipper“ eine starke Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen ausbilden (Landschulz et al. (1988) *Science* 240:1759-64), genutzt werden, um das jeweils separat exprimierte Phagenhüllprotein und das cDNA-kodierte Protein zu einem Heterodimer zu verbinden. Dazu wurde von einem LacZ-Promotor gesteuert, ein Fusionsprotein exprimiert, das am N-Terminus aus cJun und am C-Terminus aus einem Phagenhüllprotein (pIII) bestand und ein zweites Fusionsprotein, das am N-Terminus aus cFos und am C-Terminus aus einer cDNA-Bank bestand, wobei auch dieses Protein durch einen zweiten LacZ-Promotor gesteuert wurde. Durch die Interaktion von cJun und cFos über die jeweiligen Leuzin-Zipper im Periplasma eines Bakteriums wurde dadurch die Präsentation von Protein bzw. Proteinfragmenten, die durch cDNAs kodiert sind auf filamentösen Phagen möglich.

Beim Einsatz der Phagendisplay-Technologie gibt es das weitere Problem, daß die Assemblierung der Phagen und somit auch der Einbau der Fusionsproteine in die Phagenpartikel ausschließlich im Periplasma stattfindet (Russel et al. (1997) *Gene* 192(1):23-32). Um die jeweiligen Fusionsproteine ins Periplasma der Bakterienzelle zu exportieren, muß demnach gegebenenfalls gentechnisch eine Sec-Signalsequenz an das Fusionsprotein angefügt werden. Diese Signalsequenz bewirkt, daß die Fusionsproteine in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand ins Periplasma transportiert werden. Eine beträchtliche Anzahl von Proteinen kann jedoch nicht mittels des Sec-Transportwegs ins Periplasma gelangen, da sogenannte „Stop-

Transfer“-Sequenzen oder eine zu schnelle Faltung des Proteins, die bereits ins Zytoplasma erfolgt, einen Transport verhindern. „Stop-Transfer“-Sequenzen bewirken durch eine lokale Häufung positiv-geladener Aminosäuren in der Proteinsequenz, daß das entsprechende Protein bei der Translokation über den Sec-Transportweg in der inneren Membran stecken bleibt.

- 5 Proteine, die durch ihre schnelle und/oder stabile Faltung nicht mehr in der entfalteten Form von den Proteinen des Sec-Transportweges – insbesondere von SecB – gebunden werden können, werden nicht zum Sec-Translokase-Komplex transportiert und verbleiben im Cytoplasma (Yamane et al. (1988) J. Bio. Chem. 263:19690-19696 und Berks, B. C. (1996) Mol. Microbiol. 22:393-404 und Berks, B. C. et al. (2000) Mol. Microbiol. 35:260-274). Proteine,
- 10 die auf reduzierende Bedingungen oder die für ihre Funktionsfähigkeit auf zytoplasmatische Co-Faktoren, wie beispielsweise FeS-Zentren oder Molybdopterin angewiesen sind, können ebenfalls nicht über den Sec-Transportweg in funktioneller Form ins Periplasma gelangen.
- Aufgrund der Inkompatibilität mit dem Sec-Transportweg können demnach viele Polypeptide nicht funktionell gefaltet mit dem Phagendisplay präsentiert und anschließend selektiert werden.
- 15 Die Translokation der Fusionsproteine über den Sec-Transportweg ins Periplasma stellt daher einen wesentlichen Nachteil der im Stand der Technik bekannten Phagendisplay-Techniken dar.

- Aus den unterschiedlichen Anforderungen an das zelluläre Milieu bei Faltung bestimmter Proteine ergibt sich ein weiteres Problem bei der Expression von Fusionsproteinen insbesondere in
- 20 Bakterien, wenn der eine Teil des Fusionsproteins nur im Periplasma eine korrekte Faltung annimmt, wie das z.B. bei Antikörperproteinen der Fall ist (Gao, C. et al. (2002) siehe oben) und der andere Teil des Fusionsproteins nur im Zytoplasma korrekt gefaltet werden kann, wie das z.B. beim grün-floreszierenden Protein (GFP) der Fall ist, das Sec-inkompatibel ist. So ist
- 25 z.B. die Expression von Antikörper-GFP-Fusionsprotein, d.h. von Fluoreszenz-markierten Antikörpermolekülen, in Bakterien bisher nicht möglich. Die Beschränkung auf den Sec-Transportweg verhindert somit die Herstellung einer Vielzahl interessanter Proteinkonjugate insbesondere in Bakterien.

- 30 Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin die Einschränkung der im Stand der Technik bekannten Phagendisplay-Technologie auszuräumen und die Herstellung von Fusionsproteinen zu ermöglichen, die bei Herstellung durch die im Stand der Technik bekannten Verfahren nicht zu funktionellen Fusionsproteinen führen.

Die vorliegende Erfindung stellt daher in einem Aspekt ein Proteingemisch zur Verfügung, enthaltend: a) mindestens ein erstes Fusionsprotein, enthaltend: i) ein Protein oder Proteinfragment, ii) eine Interaktionsdomäne und iii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, und b) mindestens ein zweites Fusionsprotein, enthaltend: i) ein Protein oder Proteinfragment, ii) eine Interaktionsdomäne und iii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

Das Protein oder Proteinfragment des ersten Fusionsproteins umfaßt vorzugsweise Proteine, die im ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran eines Bakteriums, vorzugsweise eines Gram-negativen Bakteriums transloziert werden können und die demnach nicht für ihre korrekte Faltung auf das reduzierende zytoplasmatische Milieu und/oder auf zytoplasmatische Co-Faktoren angewiesen sind und die auch im Periplasma eine im wesentlichen korrekte Faltung erreichen können. Beispiele solcher Proteine umfassen, sind aber nicht limitiert auf schwere Immunoglobulinketten, leichte Immunoglobulinketten, Fragmente dieser Ketten, sogenannte „Single-Chain-Antikörper“ (Bird, R. E. (1988) Science 242:423-6), Antibodies (Holliger, P. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90(14):6444-8, Rezeptoren, vorzugsweise extrazelluläre Domänen von Rezeptoren, wie beispielsweise, EGFR, PDGFR oder VEGFR, oder Rezeptorliganden, wie beispielsweise EGF, PDGF oder VEGF, Integrine, vorzugsweise deren extrazelluläre Domänen, Intimine und deren Domänen, wie beispielsweise EaeA, Kohlenhydrat-bindende Proteine und Domänen davon, wie MBP und CBD, Albumin-bindende Proteine und Domänen oder Protein A und dessen Domänen.

Das Protein oder Proteinfragment des zweiten Fusionsproteins kann ein beliebiges Protein oder Proteinfragment sein, bevorzugt sind jedoch Proteinfragmente, die ihre Faltung und/oder ihre Funktion nur dann erhalten, wenn sie sich bereits im Zytoplasma eines Bakteriums falten und daher in einen im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran in das Periplasma transloziert werden. Beispiele solcher Proteine sind autofluoreszierende Proteine, wie beispielsweise GFP oder Varianten davon mit veränderten Absorptionsmaxima, Enzyme, wie beispielsweise β -Lactamase, Cofaktor-abhängige Proteine, wie beispielsweise

TMAO-Reduktase und Meerrettich-Peroxidase, Proteine, die von einer cDNA kodiert werden, welche aus einer cDNA-Bibliothek stammt, oder synthetische Proteine.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Protein oder Proteinfragment des ersten Fusionsproteins und die Proteintranslokationssequenz ein Phagenhüllprotein oder ein periplasmatisches Markerenzym, wie PhoA, ein Intimin ein Protein der äußeren Bakterienmembran oder ein periplasmatisches Rezeptorprotein, insbesondere ein Kohlenhydrat-bindendes Protein. Bevorzugte Phagenhüllproteine, die in einem Proteingemisch der vorliegenden Erfindung enthalten sein können, sind ausgewählt aus den M13-Phagemid Hüllproteinen pIII, pVI, pVII, 10 pVIII und pIX. Von diesen Phagenhüllproteinen sind jedoch nur pIII und pVIII mit einer bekannten Sec-abhängigen Proteintranslokationssequenz versehen, wobei die in den restlichen Phagenhüllproteinen enthaltenden Proteintranslokationssequenzen noch nicht identifiziert worden sind. Da diese Phagenhüllprotein dennoch in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand in das Periplasma des Bakteriums transportiert werden, werden solche Proteine im 15 Sinne der Erfindung auch ohne Identifikation der Proteintranslokationssequenz als Proteine angesehen, die aus einem Protein oder Proteinfragment und einer Proteintranslokationssequenzen bestehen.

20 Die Interaktionsdomänen, die in dem ersten und zweiten Fusionsprotein verwendet werden, führen zur Bindung des ersten Fusionsproteins an das zweite Fusionsprotein. Bevorzugt sind hierbei Interaktionsdomänen, die zu einer relativ festen Interaktion der beiden Proteine führen, wobei eine relativ feste Interaktion eine Interaktion ist, die auch im oxidativen Milieu des Periplasmas, auf der Bakterienzelloberfläche oder bei der Sezernierung des Heterodimers oder Heteromultimers auch außerhalb der Zelle bestehen bleibt. Geeignete Interaktionsdomä- 25 nen des ersten und zweiten Fusionsproteins, die erfindungsgemäß in den Fusionsproteinen enthalten sein können, sind beispielsweise eine Leuzin-Zipper-Domäne und eine Leuzin-Zipper-Domäne, wie sie zuerst in den zwei Oncoproteinen cJun und cFos beschrieben wurden (Landschulz et al. (1988) siehe oben) Varianten davon aus anderen Hetero- oder Homodimeren sowie artifizielle Leuzin-Zipper-Domänen oder eine Helix-Loop-Helix-Domäne und eine 30 Helix-Loop-Helix-Domäne (Moor et al. (1989) Cell 56:777-783), ein Calmodulin und ein Calmodulin-bindendes Peptid (Montigiani, S. et al. (1996) JMB 258:6-13) oder jeweils ein Peptid eines Peptid-Dimers. Der Begriff Interaktionsdomänen umfaßt auch Domänen die eine Multimerisierung von mehr als zwei Fusionsproteinen erlauben.

Die Proteintranslokationssequenz des ersten Fusionsproteins bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium, vorzugsweise in einem Gram-negativen Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran in das Periplasma transloziert wird. Der Fachmann ist ohne weiteres in der Lage, entsprechende Proteintranslokationssequenzen aufzufinden, wobei er sich des folgenden Experiments bedienen kann. Eine potentielle als Proteintranslokationssequenz geeignete Proteinsequenz, die zur Translokation eines damit fusionierten Proteins in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand führt, wird mit einem ein GFP-myc-TAG enthaltenden Protein fusioniert. Wenn die potentielle Proteintranslokationssequenz nicht zur Proteintranslokation ins Periplasma führt, wird das GFP-Protein im Zytoplasma des Bakteriums gebildet, was sich über die zytoplasmatische Fluoreszenz nachweisen läßt, es gelangt dann jedoch nicht an die Oberfläche oder ins Medium, so daß der Myc-TAG durch einen anti-Myc-Antikörper bspw. den monoklonalen Antikörper 9E10 weder im Medium noch auf der Oberfläche nachweisbar ist. Führt die Sequenz jedoch zur Translokation des Fusionsproteins ins Periplasma und schließlich zur Präsentation auf der Oberfläche bzw. zur Sezernierung in die Umgebung des Bakteriums, so läßt sich das präsentierte bzw. sezernierte GFP-myc-TAG-Fusionsprotein durch einen Anti-myc-Antikörper im Medium und/oder auf der Oberfläche des Bakteriums nachweisen. Gleichzeitig sollte im Periplasma in diesem Fall keine Fluoreszenz beobachtet werden können, da bei Translokation des GFPs ins Periplasma in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand sich das Protein dort nicht mehr korrekt faltet (sogenannte „Sec-Inkompatibilität“). Die Proteintranslokationssequenzen die bevorzugt im ersten Fusionsprotein verwendet werden sind solche, die in dem Sec-abhängigen Transportweg (Danese, P. N. und Silhavy, T. J. (1998) *Annu. Rev. Genet.* 32:59-94), die in dem SRP-abhängigen Transportweg (Meyer, D. I. et al. (1982) *Nature* 297:647-650) oder die in einem YidC-abhängigen Transportweg erkannt werden (Samuelson, J. C. et al. (2000) *Nature* 406:637-641). Allerdings kann es sich auch um eine Transportweg-unabhängige Sequenz handeln. Besonders geeignete Proteintranslokationssequenzen sind daher beispielsweise Signalsequenzen des PhoA, PelB, OmpA und pIII.

Als weiterer Bestandteil enthält das zweite Fusionsprotein eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium, vorzugsweise in einem Gram-negativen Bakterium, in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird. Eine Proteintranslokationssequenz mit dieser Eigenschaft liegt dann vor, wenn ein Protein, beispielsweise GFP, das nur im Zytoplasma des Bakteriums seine funktionelle Konformation einnehmen kann, ohne Verlust der Autofluores-

zenz ins Periplasma transportiert wird. Diese Eigenschaft der erfindungsgemäßen Proteintranslokationssequenz läßt sich mit dem vorangehend im Hinblick auf die erste Proteintranslokationssequenz beschriebenen Experiment, untersuchen. Mit einem ähnlichen Experiment wurde bereits ein Konsensusmotiv für das Tat-spezifische Führungspeptid des Twin-Arginine-Translokation-(Tat)-Transportwegs von Bakterien und Pflanzenchloroplasten ermittelt. Der im Stand der Technik bekannte Tat-Transportweg erlaubt den Transport von bereits im Zytoplasma gefalteten Proteinen ins Periplasma und kann somit Proteine, die mit dem Sec-Transportweg inkompatibel sind, ins Periplasma transportieren. Genau wie der Transport über den Sec-Transportweg, wird auch der Tat-Transportweg durch eine spezielle Gruppe von Führungssequenzen vermittelt (DeLisa, M. P. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:29825-29831). Ein weiterer im Stand der Technik bekannter Transportweg, der den Transport von Proteinen in im wesentlichen gefalteten Zustand erlaubt, ist der über Thylakoid-Membranen (Settles, A. M. und Martienssen, R. (1998) Transcell Biol. 8:494-501). Daher enthält das zweite Fusionsprotein in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Signalsequenz, die von einem Tat-abhängigen Transportweg oder von einem Thylakoid- Δ ph-abhängigen Transportweg erkannt wird und dadurch zur Translokation des Fusionsproteins in im wesentlichen gefalteten Zustand führt. Ein Konsensusmotiv einer Proteintranslokationssequenz, das von einem Tat-abhängigen Transportweg erkannt wird, ist in DeLisa, M. P. et al. ((2002) siehe oben) beschrieben worden. Die Sequenz lautet: S/T/RRXFLK.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Proteingemisches sind mindestens ein erstes und mindestens ein zweites Fusionsprotein aneinander kovalent oder nicht-kovalent gebunden. Zur Erreichung einer kovalenten Bindung der zwei getrennt exprimierten Fusionsproteine können beispielsweise in dem Protein zusätzlich nahe der Interaktionsdomäne Cysteinreste oder Homologe davon angeordnet werden, die im oxidativen Milieu des Periplasmas eine kovalente Bindung zwischen den beiden Fusionsproteinen herstellen. Eine kovalente Bindung kann jedoch beispielsweise auch durch die Inkorporation von Aminosäuren mit Foto-aktivierbaren Gruppen in die beiden Fusionsproteine und anschließende UV-Exposition der zunächst lediglich nicht-kovalent aneinander gebundenen Proteine erreicht werden. Dem Fachmann sind weitere Verfahren bekannt, um zwei zunächst allein durch nicht-kovalente Bindung verbundene Proteine miteinander zu verbinden. Zu diesem dem Fachmann bekannten Verfahren der kovalenten Verbindung zweier nicht-kovalent-gebundener Fusionsproteine zählt beispielsweise das Psoralen-Crosslinking.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Nukleinsäuregemisch, das für ein erfindungsgemäßes Proteingemisch kodiert. Eine kodierende Nukleinsäure, im Sinne der Erfindung ist ein Nukleinsäuresequenz, die für ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Vorläufer davon kodiert. Bevorzugterweise handelt es sich bei dem Nukleinsäuregemisch um

5 DNA oder RNA, vorzugsweise um eine DNA, wobei die DNA einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegen kann. Die jeweils für das erste oder zweite Fusionsprotein kodierende Nukleinsäure enthält des weiteren Promotoren, die die Expression des jeweiligen Fusionsproteins in der Wirtszelle ermöglichen. Geeignete Promotoren für die Expression in beispielsweise *E. coli* sind der *trp*-Promotor, *lacZ*-Promotor, *tet*-Promotor, T7-Promotor oder *ara*-

10 Promotor. Weitere Elemente, die in den jeweiligen, das Nukleinsäuregemisch ausmachenden Nukleinsäuren vorhanden sein können, sind Replikationsursprünge (Ori), selektive Markergene, die beispielsweise Ampizilin- oder Chloramphenikolresistenz vermitteln. Die Nukleinsäuren können neben dem für das jeweilige Fusionsprotein kodierenden Bereich, die üblicherweise in bakteriellen Expressionsvektoren verwendeten Elemente aufweisen. Dem Fachmann

15 sind eine Vielzahl solcher Elemente sowie Vektoren bekannt, wie beispielsweise pGEM oder pUC.

In einer bevorzugten Ausführungsformen des Nukleinsäuregemisches der vorliegenden Erfindung, sind die zwei Nukleinsäuren, die für das erste und zweite Fusionsprotein kodieren, kovalent miteinander verbunden, vorzugsweise über Phosphordiester-Bindungen. Insbesondere

20 sind die Nukleinsäuremoleküle, die für das erste und zweite Fusionsprotein kodieren und geeignete regulatorische Elemente enthalten, auf einem Plasmid enthalten, so daß die erfindungsgemäßen Proteingemische bereits durch Transfektion nur eines Plasmids bzw. wenn diese Nukleinsäure in einem Phagen enthalten ist, durch Infektion mit nur einem Phagen beispielsweise in einem Bakterium hergestellt werden können. In einer bevorzugten Ausführungsform werden beide Fusionsprotein unter der Kontrolle nur eines Promotors als bicistronische Kasette exprimiert.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, enthaltend ein erfindungsgemäßes Proteingemisch und/oder enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuregemisch. Ein Vektor, im Sinne der vorliegenden Erfindung, ist ein Protein-Nukleinsäuregemisch, das in der Lage ist, die in ihm enthaltenen Proteingemische und/oder Nukleinsäuregemisch in eine Zelle einzuführen. Dabei ist es bevorzugt, daß dabei die von den Nukleinsäuregemischen kodierten Fusionsproteine in der Zelle zur Expression kommen und

30

somit de *nov*o synthetisierte Fusionsproteine aus der Zelle gewonnen, bzw. auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Geeignete Vektoren sind beispielsweise nicht-lytische Phagen, wie M13-Phage, fd-Phage, F1-Phage und lytische Phagen, wie λ -Phage.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ist eine Zelle, enthaltend ein erfindungsgemäßes Proteingemisch, ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuregemisch und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor. Erfindungsgemäße Zellen können prokaryontische oder eukaryontische Zellen sein. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Zellen um prokaryontische Zellen, insbesondere
- 10 um Bakterien und noch bevorzugter um *E. coli* (TG1, XL-1, JM83, BL21) oder *B. subtilis*.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Bibliothek, enthaltend mindestens zwei erfindungsgemäße Proteingemische, mindestens zwei erfindungsgemäße Vektoren und/oder mindestens zwei erfindungsgemäße Zellen, wobei die Proteine oder Proteinfragmente
- 15 te der jeweiligen ersten oder jeweiligen zweiten Fusionsproteine voneinander unterschiedlich sind. Eine solche Bibliothek kann entweder gezielt ausgewählte unterschiedliche bekannte Proteine oder Proteinfragmente enthalten oder die Interaktionsdomäne und die Proteintranslokationssequenz des ersten oder zweiten bevorzugt des zweiten Fusionsproteins können mit einer cDNA-Bibliothek fusioniert werden, wobei bei Expression dieser Nukleinsäuren eine
- 20 Vielzahl unterschiedlicher erster oder zweiter Fusionsproteine entstehen, die jeweils unterschiedliche Proteine oder Proteinfragmente enthalten. Vorzugsweise wird dabei der cDNA-Anteil am C-Terminus des Fusionsproteins exprimiert, um dadurch das vorangehend geschilderte Problem bei N-terminaler Fusion einer cDNA zu umgehen. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Bibliothek eine Vielzahl von erfindungsgemäßen Zellen, wobei jede
- 25 Zelle ein anderes Proteingemisch herstellt, vorzugsweise auf ihrer Oberfläche präsentiert. Im Falle, daß das Protein oder Proteinfragment und die Interaktionsdomäne des ersten Proteins ein Phagenhüllprotein ist, erlaubt die erfindungsgemäße Bibliothek die Präsentation einer Vielzahl von Proteinen oder Proteinfragmenten, die im zweiten Fusionsprotein enthalten sind. Dabei ist die Präsentation nicht wie bei den im Stand der Technik bekannten Phagendisplay-Bibliotheken auf Proteine oder Proteinfragmente beschränkt, die sich im Periplasma der Zelle
- 30 zu ihrer funktionellen Form falten, sondern umfaßt auch Proteine, die nur im Zytoplasma ihre funktionelle Faltung erlangen können.

Die erfindungsgemäßen Proteingemische, die Heterodimere oder Multimere bilden können, wobei die Bestandteile der Heterodimere oder Multimere in mindestens zwei unterschiedlichen zellulären Kompartments ihre dreidimensionale Struktur erhalten haben, lassen sich nunmehr in einer Reihe von Verfahren unter anderem auch im Phagendisplay einsetzen.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die an ein Proteingemisch, einen erfindungsgemäßen Vektor oder an eine erfindungsgemäße Zelle binden, enthaltend die Schritte:

10

a) In-Kontaktbringen mindestens einer potentiell-bindenden Substanz mit einem erfindungsgemäßen Proteingemisch, einem erfindungsgemäßen Vektor oder einer erfindungsgemäßen Zelle und

b) Messen der Bindung der Substanz an das Proteingemisch, den Vektor und/oder die Zelle.

15 Das Verfahren dient somit vorzugsweise dem Auffinden einer Substanz oder von Substanzen, die an ein bereits bekanntes Proteintarget binden, beispielsweise um Inhibitoren, Aktivatoren, Kompetitoren oder Modulatoren des bekannten Proteintargets aufzufinden. Die potentiell bindenden Substanzen deren Bindung an ein erfindungsgemäßes Proteingemisch, einen erfindungsgemäßen Vektor und/oder eine erfindungsgemäße Zelle gemessen werden soll, kann
20 jede beliebige chemische Substanz oder jedes beliebige Substanzgemisch sein. Beispielsweise kann es sich hierbei um Substanzen einer Peptid-Bibliothek handeln, um Substanzen aus einer kombinatorischen chemischen Bibliothek, um Zellextrakte, insbesondere Pflanzenzellextrakte, und um Proteine oder Proteinfragmente.

25 Unter In-Kontaktbringen der potentiell bindenden Substanz(en) mit einem erfindungsgemäßen Proteingemisch, Vektor oder Zelle wird jede Möglichkeit der Wechselwirkung zwischen den beiden Komponenten verstanden, wobei sich die beiden Komponenten jeweils unabhängig voneinander in flüssiger Phase, beispielsweise in Lösung oder in einer Suspension, befinden können oder auch an eine feste Phase, beispielsweise in Form einer im wesentlichen planaren Oberfläche oder in Form von Partikeln, Perlen oder ähnlichem, gebunden sein können.
30 In einer bevorzugten Ausführungsform ist eine Vielzahl unterschiedlicher potentiell bindender Substanzen an einer festen Oberfläche immobilisiert und wird mit den erfindungsgemäßen Proteingemisch, dem erfindungsgemäßen Vektor oder der erfindungsgemäßen Zelle In-Kontakt gebracht und anschließend wird die Bindung der erfindungsgemäßen Substanzen an

den verschiedenen Positionen, an denen jeweils unterschiedliche potentiell-bindende Substanzen immobilisiert sind, gemessen.

5 Das Messen der Bindung des erfindungsgemäßen Proteingemisches, des Vektors oder der Zelle, an eine potentiell bindende Substanz kann beispielsweise über die Messung eines mit dem erfindungsgemäßen Proteingemisch, mit dem erfindungsgemäßen Vektor oder der erfindungsgemäßen Zelle verbundenen Markers geschehen, wobei geeignete Marker dem Fachmann bekannt sind und beispielsweise Fluoreszenz- oder radioaktive Marker umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Proteingemisch, der Vektor oder die Zelle
10 zusätzlich im zweiten Fusionsprotein neben dem Protein oder Proteinfragment, dessen Wechselwirkung mit den potentiell-bindenden Substanzen untersucht werden soll, ein autofluorezierendes Protein, wie beispielsweise GFP oder Varianten davon. Das Messen der Bindung der Substanz kann jedoch auch über die Änderung von elektrochemischen, insbesondere Redoxeigenschaften beispielsweise der immobilisierten potentiell bindenden Substanzen nach
15 In-Kontaktbringen gemessen werden. Geeignete Verfahren umfassen beispielsweise potentiometrische Methoden. Weitere Verfahren zum Nachweis der Bindung zweier Moleküle oder Molekülgemische, sind dem Fachmann bekannt und können gleichermaßen zum Messen der Bindung der potentiell-bindenden Substanz an das erfindungsgemäße Proteingemisch, den erfindungsgemäßen Vektor oder die erfindungsgemäße Zelle verwendet werden.

20 Gegebenenfalls können vor, zwischen oder nach den Schritten des erfindungsgemäßen Verfahrens weitere Schritte eingeführt werden, wie beispielsweise das ein- oder mehrmalige Waschen nach dem In-Kontaktbringen, um beispielsweise unspezifische Bindungen zwischen der potentiell bindenden Substanz und dem erfindungsgemäßen Proteingemisch, dem erfindungsgemäßen Vektor oder der erfindungsgemäßen Zelle zu lösen.
25

Als weitere Schritte nach dem Messen der Bindung der Substanz kann eine bindende Substanz z.B. auf Grund der gemessenen Bindungsstärke ausgewählt werden und dann direkt bspw. zur Inhibition des bekannten Proteintargets verwendet werden. Die bindende Substanz
30 kann jedoch auch durch im Stand der Technik bekannte Verfahren, die auch Verfahren der kombinatorischen Chemie umfassen modifiziert werden. Beispielsweise durch das Anfügen von Halogensseitengruppen, vorzugsweise F oder Cl, durch das Anfügen von niedriger Alkylgruppen, wie Methyl-, Ethyl-, n-Propyl-, iso-Propyl-, n-Butyl-, iso-Butyl- oder tert-Butylgruppen oder durch das Anfügen von Amino-, Nitro-, Hydroxyl-, Amido- oder Carbon-

säuregruppen. Die so unterschiedlich modifizierten bindenden Substanzen können dann erneut in dem erfindungsgemäßen Verfahren auf ihre Bindung getestet werden und hinsichtlich der gewünschten Bindungsspezifität und dem dadurch erzielten Effekt (beispielsweise Aktivierung, Inhibierung oder Modulation der jeweiligen Aktivität) optimiert werden.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Auffinden von Proteinen oder Proteinfragmenten, die an eine Testsubstanz binden, enthaltend die Schritte:

- a) In-Kontaktbringen mindestens einer Testsubstanz mit einer erfindungsgemäßen Bibliothek und
- 10 b) Messen der jeweiligen Bindung der Testsubstanz an die unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren und/oder Zellen der erfindungsgemäßen Bibliothek.

Bei diesem Verfahren sollen Proteine oder Proteinfragmente ausgewählt werden, die an eine gegebene Testsubstanz binden. Vorzugsweise handelt es sich dabei um die Proteine oder Proteinfragmente des zweiten Fusionsproteins, da diese mit einer größeren Wahrscheinlichkeit korrekt gefaltet sind, als die Proteine oder Proteinfragmente des ersten Fusionsproteins, die nur dann korrekt gefaltet sind, wenn die jeweiligen Proteine auch im oxidativen Mileu des Periplasmas ihre native Konformation annehmen können. Eine Testsubstanz im Sinne der vorliegenden Erfindung kann jede beliebige chemische Substanz oder ein Gemisch davon sein. Vorzugsweise handelt es sich dabei jedoch um ein Protein oder Proteinfragment, insbesondere um einen Rezeptor, einen Rezeptorliganden, einen Transkriptionsfaktor, einen Ionenkanal, ein Molekül der Signaltransduktionskaskade, Struktur- und Speicherprotein, Toxin oder Lichtrezeptor- und Pigmentprotein. Das Messen der jeweiligen Bindung der unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren und/oder Zellen der Bibliothek an die Testsubstanz kann wie vorangehend beschrieben, über markierungsabhängige oder markierungsunabhängige Meßverfahren erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens enthält das Verfahren die weiteren Schritte: Auswählen mindestens eines Proteingemisches, eines Vektors oder einer Zelle aufgrund der gemessenen Bindung und Herstellen einer zweiten Bibliothek, wobei die Bibliothek durch Modifikation des im ausgewählten Proteingemisch, im ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltenen Proteins oder Proteinfragments erzeugt wird. Der Auswahlprozeß von Proteingemischen, Vektoren oder Zellen aus der Bibliothek wird vorzugsweise aufgrund der Stärke der Bindung durchgeführt, wobei die Protein-

gemische, Vektoren oder Zellen bevorzugt sind, die die stärkste Bindung an die jeweilige Testsubstanz zeigen. Ausgehend von der Aminosäuresequenz des im ausgewählten Proteingemisch, Vektor oder Zelle enthaltenen Proteins oder Proteinfragments, die durch Standardverfahren bestimmt werden kann, können Modifikation erzeugt werden, die jeweils zu geringen Änderungen der Aminosäuresequenz führen und damit zu einer Vielzahl von Derivaten, die im Vergleich zum Ausgangsprotein bzw. Proteinfragment eine leicht veränderte dreidimensionale Struktur besitzen. Solche Modifikationen lassen sich durch im Stand der Technik bekannte Verfahren beispielsweise durch Zufallsmutagenese oder auch durch gezielte Substitution einzelner Nukleinsäurecodons, der für das Protein oder Proteinfragment kodierenden Nukleinsäure, erhalten. Bevorzugt sind dabei Substitution, die sogenannte „konservative“ Substitutionen sind. Eine konservative Substitution liegt dann vor, wenn beispielsweise ein für eine basische Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon durch ein anderes für eine basische Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon, ein für eine saure Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon durch ein anderes für eine saure Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon bzw. ein für eine polare Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon durch ein anderes für eine polare Aminosäure kodierendes Nukleinsäurecodon ersetzt wird.

Die auf Grundlage der ausgewählten Proteingemische, Vektoren oder Zellen neu erzeugten zweiten Bibliotheken können nunmehr in einem weiteren Schritt wiederum mit der Testsubstanz in Kontakt gebracht werden, worauf in einem weiteren Schritt die jeweilige Bindung der Testsubstanz an die modifizierten Proteingemische, Vektoren oder Zellen der zweiten Bibliothek gemessen werden kann. Gegebenenfalls können nunmehr die Schritte des Auswählens mindestens eines Proteingemisches, eines Vektors oder einer Zelle aufgrund der gemessenen Bindung und die sich daran anschließend Herstellung einer dritten bzw. n-ten Bibliothek sowie das Inkontaktbringen und Messen der jeweiligen Bindung der Testsubstanz an die unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren oder Zellen der dritten bzw. n-ten Bibliothek, ein bis n-mal wiederholt werden bis ein Proteingemisch, ein Vektor oder eine Zelle ausgewählt worden ist, das, der bzw. die die gewünschte Bindung zeigt.

Das zuvor geschilderte Verfahren wird auch als gerichtete Evolution bezeichnet, da in einer Vielzahl von Schritten die aus Modifikation und Selektion bestehen, Proteine oder Proteinfragmente „evolutionär“ hinsichtlich einer bestimmten Eigenschaft, insbesondere ihrer Bindungseigenschaft weiterentwickelt werden.

Die durch das obige Verfahren aufgefundenen oder zusätzlich hinsichtlich einer bestimmten Eigenschaft optimierten Proteine oder Proteinfragmente können, wenn sie beispielsweise auf die Aktivierung oder Repression eines bestimmten zellulären Signalwegs hin optimiert worden sind, als Wirkstoff in einem Medikament eingesetzt werden. Dasselbe gilt für die bindenden Substanzen, die in dem Verfahren zum Auffinden von potentiell bindenden Substanzen identifiziert worden sind. Daher umfassen die erfindungsgemäßen Verfahren in einer bevorzugten Ausführungsform den weiteren Schritt, daß die ausgewählte bindende Substanz oder das in dem ausgewählten Proteingemisch, in dem ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltene Protein oder Proteinfragment oder eine Variante davon mit einem pharmazeutisch akzeptablem Träger und/oder Hilfsstoff gemischt wird.

Eine „Variante“ des Proteins oder Proteinfragments beinhaltet Modifikation des N- oder C-Terminus oder Modifikation von Aminosäureseitenketten, die beispielsweise die Stabilität, Löslichkeit oder Biokompatibilität des Proteins oder Proteinfragments erhöhen. Umfaßt sind jedoch auch Fusionsproteine mit den erfindungsgemäß identifizierten Proteinen oder Proteinfragmenten, die als weitere Komponenten beispielsweise autofluoreszente Marker, wie beispielsweise GFP oder Zytostatika wie beispielsweise Choleratoxin enthalten können.

Pharmazeutisch akzeptable Träger und/oder Hilfsstoffe umfassen Substanzen, die die bindende Substanz bzw. das Protein oder Proteinfragment oder seine Varianten stabilisieren, deren pharmazeutische Verträglichkeit erhöhen oder die für die jeweilige Applikationsform, wie beispielsweise Tablette, Pflaster oder Infusionslösung, erforderlich sind, wie beispielsweise Konservierungsmittel, Puffer, Salz oder Proteaseinhibitoren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Herstellung eines Nukleinsäuregemisches nach Anspruch 10 enthaltend:

- a) mindestens eine erste Nukleinsäure enthaltend mindestens eine Restriktionsschnittstelle 5' und/oder 3' von einer Nukleinsäure kodierend für ein erstes Fusionsprotein enthaltend:
 - i) eine Interaktionsdomäne und
 - ii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das erste Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird.

Dieses Kit erlaubt die Insertion einer ausgewählten Nukleinsäuresequenz 5' oder 3' von der Nukleinsäure, die für eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz kodiert, so daß im Ergebnis von der resultierenden Nukleinsäure ein Fusionsprotein kodiert wird, das am C-Terminus und/oder am N-Terminus ein durch die jeweils eingeführte Nukleinsäuresequenz kodiertes Protein oder Proteinfragment enthält. Vorzugsweise handelt es sich bei der eingeführten DNA um eine cDNA-Bibliothek, wobei diese besonders bevorzugt unter Verwendung der 3'-Restriktionsschnittstelle in die Nukleinsäure eingeführt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Kit den Leuzin-Zipper aus dem cFos-Protein und in einer weiteren Bevorzugten Ausführungsform die Tat-abhängige Proteintranslokationssequenz To-
10 rA.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits enthält das Kit des weiteren mindestens eine zweite Nukleinsäure enthaltend mindestens eine Restriktionsschnittstelle 5' und/oder 3' von einer Nukleinsäure kodierend für ein zweites Fusionsprotein enthaltend:

- 15 i) eine Interaktionsdomäne und
ii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das zweite Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

20 Diese Nukleinsäure erlaubt die Insertion 5' oder 3' von der für eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz kodierenden Nukleinsäure, so daß im Ergebnis von der resultierenden Nukleinsäure ein Fusionsprotein kodiert wird, das am N- oder C-Terminus ein von der insertierten Nukleinsäure kodiertes Protein oder Proteinfragment umfaßt. Beispielsweise können Nukleinsäuren, die für Phagenhüllproteine kodieren in die Nukleinsäure inseriert werden, wobei diese vorzugsweise in die 3'-Restriktionsschnittstelle eingeführt werden.

25 Es hat sich gezeigt, daß wenn in die zweite Nukleinsäure Nukleinsäuren eingeführt werden, die für Phagenhüllproteine kodieren, daß die resultierenden Fusionsproteine bei starker Expression von beispielsweise dem gIIIp-Fusionsprotein zu einer hohen Toxizität für *E. coli*-Zellen führen. Aus diesem Grund wird bei klassischen Phagendisplayssystemen ein Amber-Codon 5' von dem gIII-Protein eingefügt. In Suppressorstämmen (z.B. XL-1 Blue) wird dadurch die Expression des gIIIp-Fusionsproteins um ca. 90% reduziert. Darüber hinaus ermöglicht das Amber-Codon (das in Nicht-Suppressorstämmen als STOP-Codon gelesen wird)

sehr einfach die lösliche Expression des zuvor mit dem Phagenprotein fusionierten und auf dem Phagen präsentierten Proteins, indem das Phagemid in einen Nicht-Suppressorstamm (z.B. BL21) eingebracht und dort die Expression durchgeführt wird. Daher enthält die erste und/oder die zweite Nukleinsäure in einer bevorzugten Ausführungsform entweder 5' oder 3' ein Amber-Codon. Vorzugsweise ist das Amber-Codon in der ersten Nukleinsäure 5' angeordnet und in der zweiten Nukleinsäure 3' angeordnet. Dadurch läßt sich in einem geeigneten bakteriellen Wirt erreichen, daß ausschließlich das in der ersten Nukleinsäure 5' eingefügte Protein oder Proteinfragment exprimiert wird und gleichzeitig der toxische Effekt des in der zweiten Nukleinsäure 3' eingefügten gIIIp verhindert wird.

10

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits ist die Interaktionsdomäne des zweiten Fusionsproteins die Leuzin-Zipperdomäne des cJun-Proteins. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die Nukleinsäure eine Nukleinsäure, die für eine Sec-abhängige Proteintranslokationssequenz insbesondere das PelB-Führungspeptid kodiert.

15

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer Zelle zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteingemisches sowie die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteingemisches, eines erfindungsgemäßen Vektors oder einer erfindungsgemäßen Zelle zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Bibliothek.

20

Ein bevorzugtes Anwendungsgebiete der erfindungsgemäßen Proteingemische, erfindungsgemäßen Phagen, der erfindungsgemäßen Zellen, insbesondere der erfindungsgemäßen Bibliotheken, enthaltend vorgenannte Proteingemische, Phagen und Zellen sowie der erfindungsgemäßen Kits, ist die Präsentation von Proteinen auf filamentösen Phagen. Ein besonderer Schwerpunkt liegt dabei auf Proteinen, die aufgrund ihrer Inkompatibilität mit dem Sec-Transportweg nicht mit Hilfe der klassischen Phagendisplay-Technologie präsentiert werden können. Als besonders bevorzugte Anwendungsbereiche ergeben sich daher die Präsentation und Selektion von cDNA-Expressionsbibliotheken und die Präsentation und Selektion von DNA-Bibliotheken zur gerichteten Evolution von Proteinen, auch „protein engineering“ genannt.

25

30

Eine weitere bevorzugte Verwendung liegt in der Herstellung von Proteinkonjugaten. Dabei ist die Verwendung dann besonders bevorzugt, wenn das Protein oder Proteinfragment des

ersten Fusionsproteins und das Protein oder Proteinfragment des zweiten Fusionsproteins jeweils unterschiedliche Anforderungen hinsichtlich der zur korrekten Faltung erforderlichen zellulären Umgebung haben. So erlaubt es die vorliegende Erfindung Antikörper direkt mit Markerproteinen gentechnisch zu fusionieren, die bei Produktion in Bakterien und Transport über den Sec-abhängigen Transportweg nicht korrekt gefaltet würden und daher bei Anwendung von Standardverfahren nicht als Markerprotein zur Markierung des Antikörper verwendet werden können. Markerproteine-Antikörperfusion, deren funktionelle Expression erst durch die vorliegende Erfindung möglich geworden ist, umfassen beispielsweise Fusionen aus autofloreszierenden Proteine, wie GFP und schweren Immunoglobulinketten, leichten Immunoglobulinketten oder „single-chain-antibodies“.

Die folgenden Abbildungen und Beispiele dienen lediglich der Illustration der Erfindung und sind nicht als Beschränkung derselben auf die konkret in den Beispielen angegebenen Ausführungsformen zu verstehen. Alle im Text enthaltenen Zitate werden hierdurch in ihrem gesamten Umfang durch Verweis aufgenommen.


Abbildungen

- Abb. 1 Konsensussequenzen Tat-abhängiger, Sec-abhängiger, SRP-abhängiger oder
YidC-abhängiger Signalsequenzen, wobei X eine beliebige Aminosäure und #
eine hydrophobe Aminosäure präsentieren.
- Abb. 2 Tat-abhängiges TorA-Signalpeptid, wobei X eine beliebige Aminosäure und #
eine hydrophobe Aminosäure präsentieren
- Abb. 3 Prinzip des TLF-Systems, wobei CT die Domäne des pIII, pelB die Sec-
Signalsequenz, TSS die Tat-Signalsequenz und POI das präsentierte Protein
bedeuten.
- Abb. 4 Restriktionskarte des Plasmids pCD4/GFP24, dessen Nukleinsäuresequenz als
SEQ ID NR: 1 im Anhang wiedergegeben ist.
- Abb. 5 Restriktionskarte des Plasmids pCA1/GFP24, dessen Nukleinsäuresequenz in
SEQ ID NR: 2 wiedergegeben ist.

Abb. 6 Restriktionskarte des Plasmids pCN1/GFP24, dessen Nukleinsäuresequenz in SEQ ID NR: 3 wiedergegeben ist.

5 Abb. 7 Kompetitiver Phagen-ELISA, wobei weiße Balken die Ergebnisse mit GFP24-präsentierende Phagen zeigen. GFP24-Phagen wurden mit Hilfe von XL-1 Blue Zelle hergestellt, die das Plasmid pCD4/GFP24 tragen. Graue Balken präsentieren die Ergebnisse, die mit β -Lactamase-tragenden Phagen erzielt wurden. β -Lactamase-präsentierende Phagen wurden in XL-1 Blue Zelle hergestellt, die das Plasmid pCD4/BLA tragen.

10

 Abb. 8 Enzymatischer Assay, der Präsentation von β -Lactamase auf Bakteriophage, wobei weißen Kreise die Ergebnisse mit GFP24-tragende Phagen zeigen. GFP24-Phagen wurden mit Hilfe von XL-1 Blue Zelle hergestellt wurden, die das Plasmid pCD4/GFP24 tragen. Schwarze Vierecke präsentieren die Ergebnisse die mit β -Lactamase-tragenden Phagen erzielt wurden. β -Lactamase-präsentierende Phagen wurden in XL-1 Blue Zelle hergestellt, die das Plasmid pCD4/BLA tragen. Gezeigt wird die Absorption bei 486 nm in Abhängigkeit von der Zeit.

15

20

Beispiele

Beispiel 1: Verwendete Vektoren

25

pCD4/GFP24 ist ein Cysteindisplay-Phagemid, das auf dem pGP-Vektor (Paschke M., et al.: (2001) Biotechniques 30: 720-725) beruht.

30

pCA1/GFP24 ist ein Cysteindisplay-Phagemid, das auf pGP-F100 basiert. Es kann für die tet^{oP}-kontrollierte Expression von Protein als Fusion von cFos-Leuzin-Zipper verwendet werden. Die Translokation des cFos-Fusionsproteins im periplasmatischen Raum wird durch die TorA-Führungspeptidsequenz (Tat-abhängige Translokationsweg) vermittelt. Das tet^{oP}-kontrollierte Transkript enthält ein zweites Cistron, von dem das c-jun::G3Ps-Fusionsprotein exprimiert wird. Das c-Jun::G3Ps wird über den Sec-abhängigen Translokationsweg in dem

periplasmatischen Raum gesteuert. Kovalente Komplexe zwischen dem cFos-Fusionsprotein und dem cJun::G3PS-Fusionsprotein werden im periplasmatischen Raum aufgrund der Dimerisierung von cJun und cFos und anschließender Ausbildung von Cysteinbindungen zwischen den Proteinen hergestellt. Das Phagemid enthält eine GFP24-Kassette, flankiert von SfiI-
5 Restriktionsstellen an den Positionen 148 und 910 und ist zwischen dem TorA-Führungspeptid und cFos angeordnet. Diese Kassette muß durch das zu präsentierende Protein ersetzt werden.

10 pCA1/GFP24 ist ein von pCD4 abgeleitetes Cysteindisplay-Phagemid, das auf dem pGP-Vektor basiert. pCD4/GFP24 ist ein Cysteindisplay-Phagnid, das auf dem pGP-Vektor (Paschke M., et al.: (2001) Biotechniques 30: 720-725) beruht. Es kann für die tet^{o-p}-kontrollierte Expression von Proteinen als Fusion mit dem cFos-Leucinzipper verwendet werden. Die Translokation des cFos-Fusionsproteins in den periplasmatischen Raum wird durch das TorA-Führungspeptid (Tat-Transportweg) vermittelt. Das tet^{o-p}-kontrollierte Transkript
15 enthält ein zweites Cistron, von dem das c-jun::G3Pss Fusionsprotein exprimiert wird (G3Pss umfaßt Aminosäuren 252 bis 406 des reifen gIII-Proteins des fd-Phagen). Das c-jun:G3Pss wird durch einen Sec-abhängigen Transportweg (pelB-Führungspeptid) in dem periplasmatischen Raum gelenkt. Kovalente Komplexe von cFos-Fusionsprotein und c-jun::G3Pss werden aufgrund der Dimerisierung zwischen cJun und cFos im periplasmatischen Raum und die anschließende Ausbildung von Cysteinbindung zwischen den Proteinen gebildet (Crameri, R.
20 und Suter M. (1993), siehe oben). Der Phagendisplay der Proteine, die mit cFos fusioniert sind, kann durch sogenannten Helferphagenrescue erreicht werden. Im Gegensatz zu pGP überträgt das Phagemid pCD4-GFP24 Chloramphenicolresistenz. Das Resistenzgen (CAT) und der tet-Repressor (TetR) werden unter Kontrolle des β -Lactamasepromotors von einer
25 bicistronischen Kassette kontrolliert. Das Transkript wird in einem λ -Phagenterminator terminiert. Die Tat-TetR-Kassette ist in umgekehrter Orientierung zu der cFos- und cJun-Fusionskassette. Eine GFP24-Kassette, flankiert an der Position 148 und 910 von SfiI-Restriktionsstellen ist zwischen dem TorA-Führungspeptid und cFos angeordnet. Diese Kassette wird durch das zu präsentierenden Protein ersetzt.

30

pCD4/Bla ist ein von pCD4/GFP24 abgeleitetes Cysteindisplay-Phagemid, bei dem mittels Restriktion mit SfiI das GFP24 Fragment durch die Sequenz der reifen TEM1 β -Lactamase ersetzt wurde. Die eingefügte Lactamaseklonierungskassette mit 5' und 3'-terminalen SfiI-Restriktionsstellen ist in SEQ ID NR: 4 wiedergegeben.

Beispiel 2: Herstellung von Bakteriophagen

5 Mit dem entsprechenden Phagemid transformierte XLI-Blue-Zellen wurden in 2 TY-Selektionsmedium bei 30°C bis zu einem OD_{600nm} von 0,5 kultiviert und dann mit dem Helferphagen VCSM13 mit einem Moi = 10-20 gemischt. Die infizierte Kultur wurde für 30 Minuten bei 37°C kultiviert und anschließend mit Kanamizin in einer Endkonzentration von 60 µg/ml versetzt. Die Kultur wurde für 10 Minuten bei 25°C kultiviert. Durch Zentrifugation (4000 x g, 4°C, 5 Minuten) wurden die Zellen geerntet und anschließend in 2 TY-Selektionsmedium enthaltend 60 µg/l Kanamizin und 0,5 µg/ml Tetracyclin resuspendiert. Diese Kultur wurde für 5 h bei 25°C kultiviert. Anschließend folgte die Phagenpräparation aus dem Zellkulturüberstand wie folgt: Jeweils 40-50 ml Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (4°C, 10.000 rpm in einem A8-24-Rotor für 15 Minuten) vom phagenhaltigen Zellkulturüberstand getrennt. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert und mit ¼ Volumen PEG-NaCl-Lösung (20% w/v PEG 8000, 50% w/v NaCl) gemischt und über Nacht oder für mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde dann bei 4°C für 15 min bei 15.000 rpm in einem A8.24-Rotor zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 2,5 ml eiskaltem PBS resuspendiert und auf 2 ml Plastikröhrchen verteilt. Dann wurde der Überstand mit ¼ Volumen PEG-NaCl-Lösung gemischt und für mindestens eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Überstand bei 4°C und 14.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Phagenniederschlag wurde in 0,5-1 ml PBS gelöst. Gegebenenfalls wurde die Phagenlösung durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und anschließend bei 4°C gelagert. Bei längerer Lagerung wurde die Phagenlösung mit 1 Volumen Glycerol versetzt und bei -70°C gelagert.

25

Der Phagentiter wurde durch Standardverfahren unter Verwendung einer Verdünnungsreihe bestimmt. Der Titer lag üblicherweise zwischen 10^{12} und 10^{13} cfu/ml.

Beispiel 3: Präsentation von funktionellem GFP24 auf Phagen

30

GFP24 ist eine zirkulärpermutierte Variante des grün fluoreszierenden Proteins, die zusätzlich ein Epitop des P24-Proteins aus HIV enthält (Höhne, W.E. et al. (1993) Mol Immunol 30:1213-21). GFP24 wird durch den anti-P24-Antikörper CB4-1 (Dr. Scholz, Institut für Biochemie, (Universitätsklinikum Charite)) mit hoher Affinität gebunden. GFP24 kann wie auch

GFP selbst nicht über den Sec-Transportweg exportiert werden. Ein funktionelles GFP24 Protein sollte daher bei Expression des oben geschriebenen pCD4/GFP24-Plasmids nur dann zur Präsentation eines funktionsfähigen GFP24 führen, wenn dieser Teil des Proteins nicht durch einen Sec-abhängigen Transportweg, sondern durch einen Tat-abhängigen Transportweg in das Periplasma transportiert worden ist. Um GFP24 auf filamentösen Phagen nachzuweisen, wurde ein Phagen-ELISA wie folgt durchgeführt. Mikrotiterplatten wurden mit 10 µl/ml anti-P24Antikörper-C4-1 beschichtet, dreimal mit PBS/Tween 0,1% gewaschen und mit 200 µl pro Vertiefung Genosys-Blockierungsreagenz (Sigma-Genosys Ltd, Cambridge, UK)) für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit PBS/Tween 20 0,1% gewaschen. Anschließend wurden 50 µl pro Vertiefung GFP24 präsentierende Phagen mit und ohne P24-Peptid in die Mikrotiterplatte gegeben und anschließend die Gegenwart des Phagen in der Mikrotiterplatte mit einem Meerrettichperoxidase gekoppelten anti-Phagen-Antikörper (Seramun Diagnostica GmbH, Dölggenbrodt, Germany)) nachgewiesen. Die Signalstärke entsprach dabei dem an CB4-1 gebundenen Phagen. pCD4/GFP24 Phagen wurden dabei vollständig von CB4-1 durch das P24-Peptid verdrängt, während β -Lactamase präsentierende Phagen (pCD4/BLA), die als Kontrolle verwendet wurden, nicht an CB4-1 gebunden wurden. Darüber hinaus konnte keine unspezifische Bindung an anderer Antikörper oder das Blockierungsreagenz beobachtet werden (s. Abb. 7).

Beispiel 4: Präsentation von TEM-1- β -Lactamase auf filamentösen Phagen

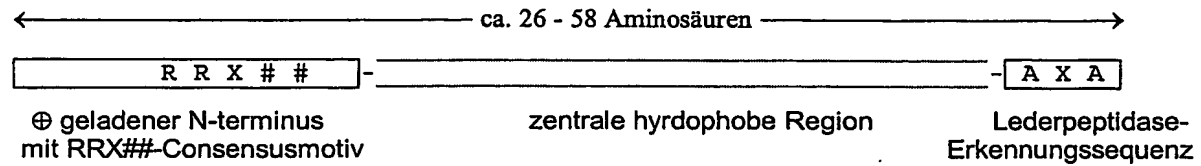
TEM-1- β -Lactamase ist ein periplasmatisches Protein, das durch die Hydrolyse des Lactamrings des Antibiotikums Ampicillin Resistenz gegen Ampicillin vermitteln kann. TEM- β -Lactamase wird normalerweise mittels des Sec-abhängigen Transportsystems ins Periplasma exportiert. Zum Nachweis, daß TEM-1- β -Lactamase auch durch den Tat-abhängigen Transportweg exportiert werden kann, wurde die Sec-Signalsequenz entfernt und durch die TorA-Sequenz ersetzt. Die erfolgreiche Präsentation von TEM-1- β -Lactamase wurde mit dem nachfolgend beschriebenen Enzymassay nachgewiesen, dessen Ergebnis in Abb. 8 dargestellt ist. 800 µl PBS pH 7,4 wurden mit 100 µl Nitrocefin-Stammlösung (500 µg/ml) gemischt und auf 25°C temperiert. 100 µl Phagenlösung wurden hinzugegeben. Die Extinktionsänderung bei 486 nm wurde photometrisch über 10 min. beobachtet. Die Absorptionsänderung bei 486 nm entspricht dabei der β -Lactamaseaktivität der Phagen. Während pCD4/GFP24-Phagen

keine β -Lactamaseaktivität zeigten, war bei pCD4/BLA eine starke β -Lactamaseaktivität zu beobachten.

Die Nitrocefinstammlösung wurde folgendermaßen hergestellt: 1 mg Nitrocefin wurde in 100
5 μ l DMSO gelöst. Diese Lösung wurde dann mit 1,9 ml PBS pH 7,4 gemischt. Die Lösung wurde für maximal zwei Wochen bei -20°C gelagert.

Abb. 1

Tat-abhängige Signalsequenz



Sec-, YidC- und SRP-abhängige Signalsequenz

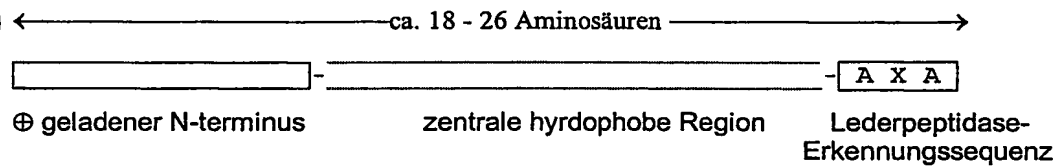


Abb. 2

M N N N D L F Q A S R R R F L A Q L G G L T
 ATGAACA ATAACGATCT CTTTCAGGCA TCACGTCGGC GTTTTCTGGC ACAACTCGGC GGCTTAACCG
 TACTTGT TATTGCTAGA GAAAGTCCGT AGTGCAGCCG CAAAAGACCG TGTGAGCCG CCGAATTGGC

⊕ geladener N-terminus mit RRX##-Consensusmotiv zentrale hydphobe Region

V A G M L G P S L L T P R R A T A
 GTCGCCGGGAT GCTGGGGCCG TCATTGTTAA CGCCGCGACG TGCGACTGCG
 CACCGGCCCTA CGACCCCGGC AGTAACAATT GCGGCGCTGC ACGCTGACGC

zentrale hydphobe Region A X A
 Lederpeptidase-
 Erkennungssequenz

Abb. 3

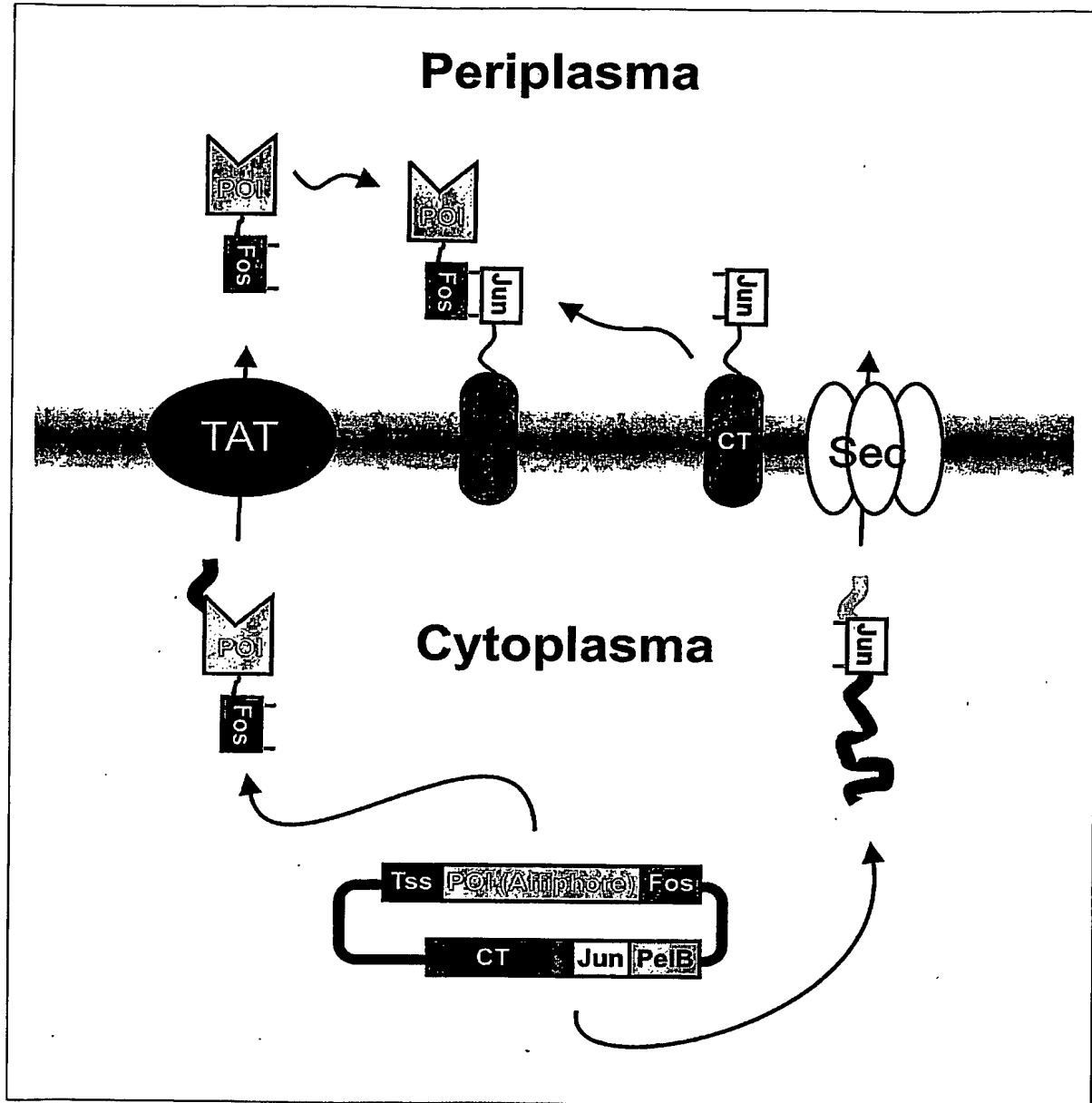


Abb. 4

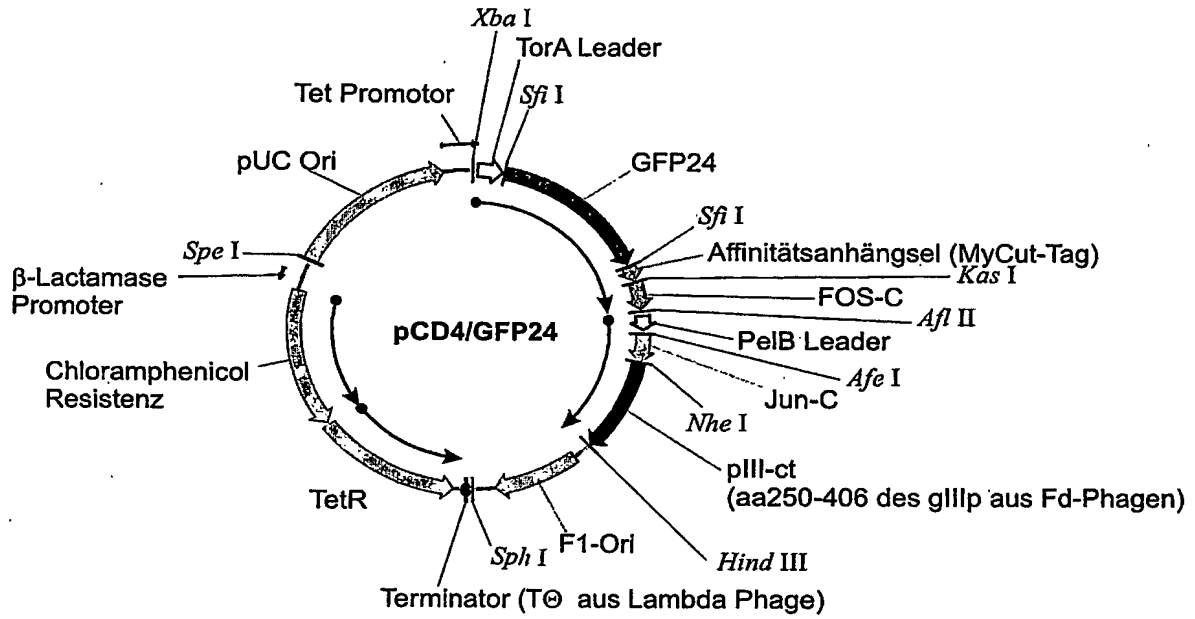


Abb. 5

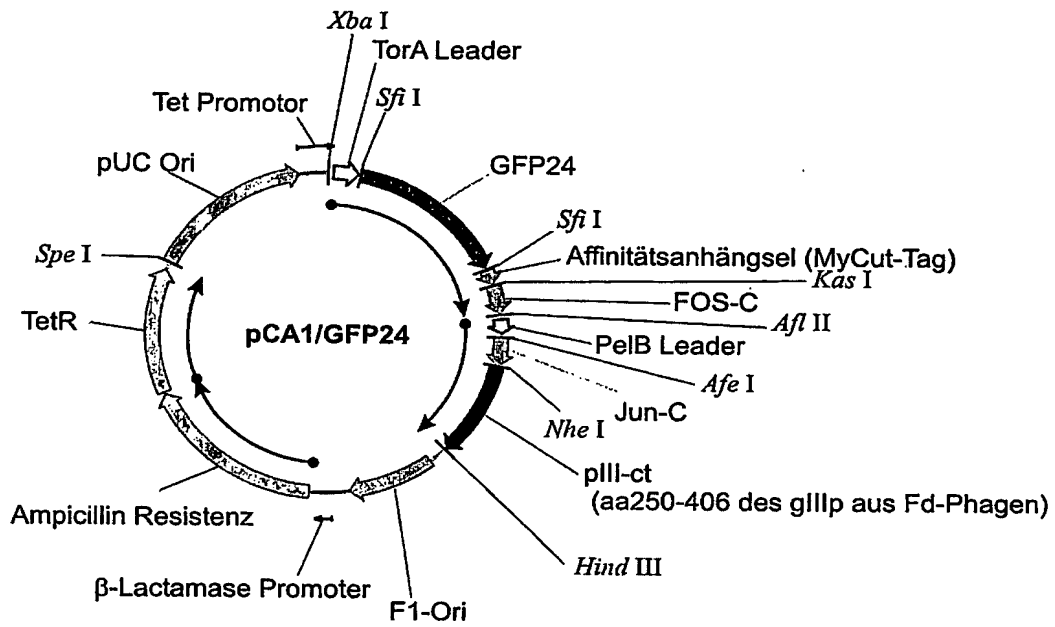


Abb. 6

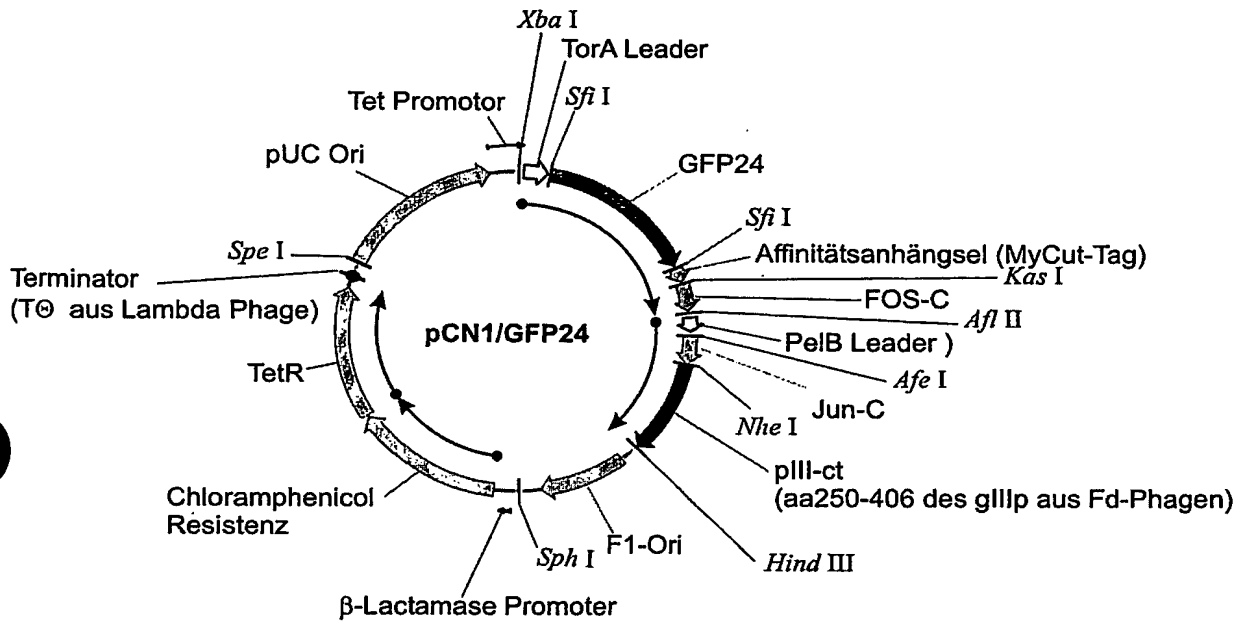


Abb. 7

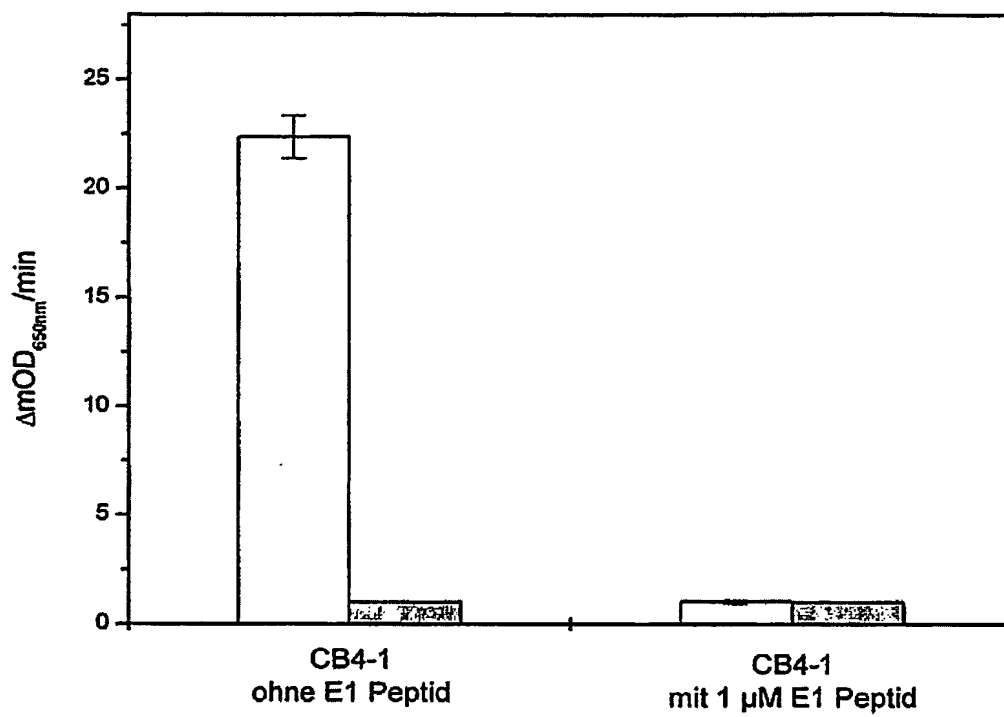
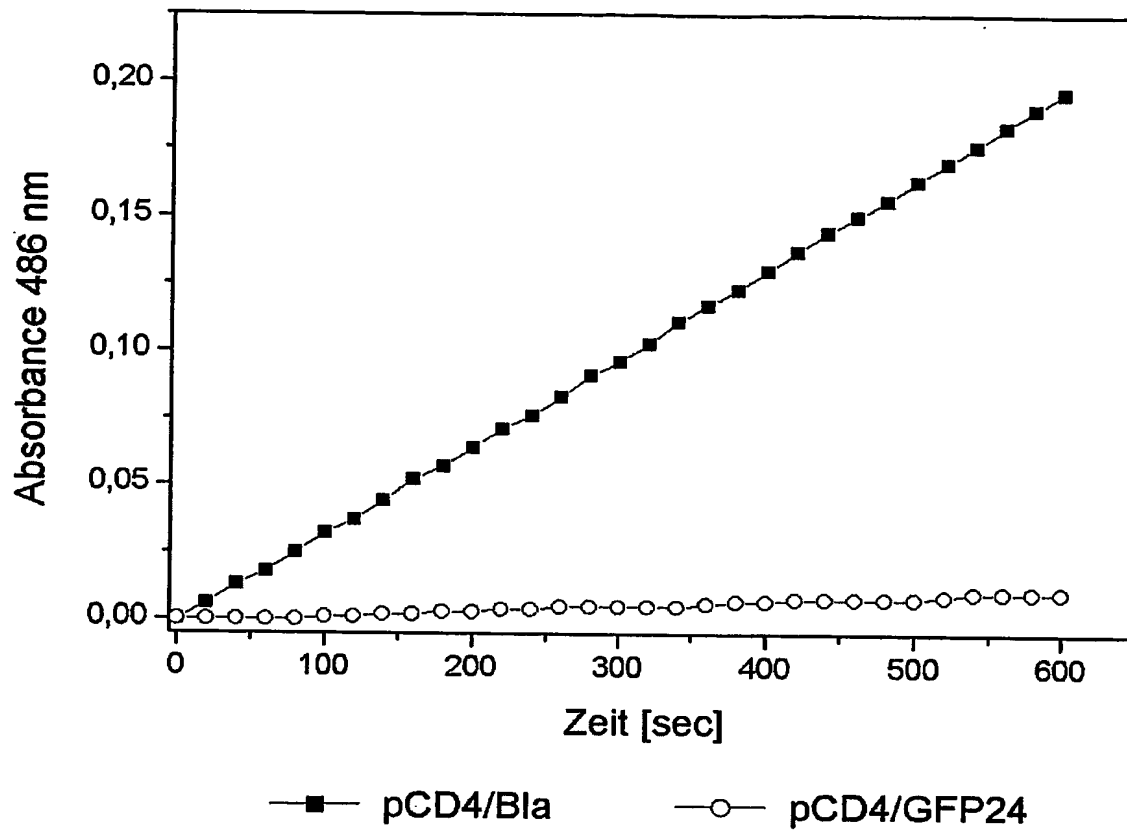


Abb. 8



Anprüche

1. Proteingemisch enthaltend:

5 a) mindestens ein erstes Fusionsprotein enthaltend:

- i) ein Protein oder Proteinfragment,
- ii) eine Interaktionsdomäne und
- iii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird,

und

15 b) mindestens ein zweites Fusionsprotein enthaltend:

- i) ein Protein oder Proteinfragment,
- ii) eine Interaktionsdomäne und
- iii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird,

wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

25

2. Proteingemisch nach Anspruch 1, wobei das Protein oder Proteinfragment des ersten Fusionsproteins eine schwere Immunoglobulinkette, eine leichte Immunoglobulinkette, ein single-chain Antikörper, ein Diabody, ein Rezeptor, ein Rezeptorligand, ein Integrin, ein Intimin, ein Kohlenhydrat-bindendes Protein, ein Albumin-bindendes Protein oder Protein A ist.

30

3. Proteingemisch nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Protein oder Proteinfragment des zweiten Fusionsproteins ein autofluoreszierendes Protein, insbesondere GFP oder eine Variante davon, ein Enzym, ein Cofaktor-abhängiges Protein, ein Protein, das von einer aus einer cDNA-Bibliothek stammenden cDNA kodiert wird, oder ein synthetisches Protein ist.
4. Proteingemisch nach Anspruch 1, wobei das Protein oder Proteinfragment des ersten Fusionsproteins und die Proteintranslokationssequenz ein Phagenhüllprotein, ein periplasmatisches Markerenzym, ein Intimin, ein Protein der äußeren Bakterienmembran oder ein periplasmatisches Rezeptorprotein ist.
5. Proteingemisch nach Anspruch 4, wobei das Phagenhüllprotein ausgewählt ist aus den M13-Phagenhüllproteinen pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX.
6. Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Interaktionsdomänen des ersten und zweiten Fusionsproteins jeweils eine Leuzin-Zipper-Domäne und eine Leuzin-Zipper-Domäne, eine Helix-Loop-Helix-Domäne und eine Helix-Loop-Helix-Domäne, ein Calmodulin und ein Calmodulin-bindendes Peptid oder ein Peptid-Dimer-Paar natürlichen oder synthetischen Ursprungs sind.
7. Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Proteintranslokationssequenz des ersten Fusionsproteins eine Sec-abhängige, SRP-abhängige, YidC-abhängige Sequenz oder eine Transportweg-unabhängige Sequenz, die in die Membran integriert wird, ist.
8. Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Proteintranslokationssequenz des zweiten Fusionsproteins eine Tat-abhängige oder Thylakoid- Δ pH-abhängige Sequenz ist.
9. Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das erste Fusionsprotein an das zweite Fusionsprotein kovalent oder nicht-kovalent gebunden ist.
10. Nukleinsäuregemisch kodierend für ein Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 8.

11. Nukleinsäuregemisch nach Anspruch 10, wobei mindestens zwei Nukleinsäuren, die für unterschiedliche Fusionsproteine kodieren, kovalent miteinander verbunden sind.
- 5 12. Vektor enthaltend ein Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und/oder ein Nukleinsäuregemisch nach einem der Ansprüche 10 oder 11.
- 10 13. Zelle enthaltend ein Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 9, ein Nukleinsäuregemisch nach einem der Ansprüche 10 oder 11 und/oder einen Vektor nach Anspruch 12.
- 15 14. Bibliothek enthaltend mindestens zwei Proteingemische nach einem der Ansprüche 1 bis 9, mindestens zwei Vektoren nach Anspruch 12 und/oder mindestens zwei Zellen nach Anspruch 13, wobei die Proteine oder Proteinfragmente der jeweiligen ersten oder jeweiligen zweiten Fusionsproteine voneinander unterschiedlich sind.
- 20 15. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die an ein Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 9, an einen Vektor nach Anspruch 12 oder an eine Zelle nach Anspruch 13 binden, enthaltend die Schritte:
- 25 a) In-Kontaktbringen mindestens einer potentiell bindenden Substanz mit einem Proteingemisch nach einem der Ansprüche 1 bis 9, einem Vektor nach Anspruch 12 und/oder einer Zelle nach Anspruch 13 und
- b) Messen der Bindung der potentiell bindenden Substanz an das Proteingemisch, den Vektor und/oder die Zelle.
- 30 16. Verfahren zum Auffinden von Proteinen oder Proteinfragmenten, die an eine Testsubstanz binden, enthaltend die Schritte:
- a) In-Kontaktbringen mindestens einer Testsubstanz mit einer Bibliothek nach Anspruch 14 und

- b) Messen der jeweiligen Bindung der Testsubstanz an die unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren und/oder Zellen der Bibliothek.

17. Verfahren nach Anspruch 16 enthaltend die weiteren Schritte:

5

- a) Auswählen mindestens eines Proteingemisches, eines Vektors oder einer Zelle auf Grund der gemessenen Bindung und
- b) Herstellen einer zweiten Bibliothek, wobei die Bibliothek durch Modifikation des im ausgewählten Proteingemisch, im ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltenden Proteins oder Proteinfragments erzeugt wird.

10

18. Verfahren nach Anspruch 16 enthaltend die weiteren Schritte:

15

- a) Auswählen mindestens eines Proteingemisches, eines Vektors oder einer Zelle auf Grund der gemessenen Bindung,
- b) Herstellen einer zweiten Bibliothek, wobei die Bibliothek durch Modifikation des im ausgewählten Proteingemisch, im ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltenden Proteins oder Proteinfragments erzeugt wird,

20

- c) In-Kontaktbringen mindestens einer Testsubstanz mit der zweiten Bibliothek,
- d) Messen der jeweiligen Bindung der Testsubstanz an die unterschiedlichen Proteingemische, Vektoren oder Zellen der zweiten Bibliothek und
- e) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte a) bis d) bis ein Proteingemisch, ein Vektor oder eine Zelle ausgewählt wird, das, der bzw. die die gewünschte Bindung zeigt.

25

30

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei in einem weiteren Schritt die bindende Substanz oder das in dem ausgewählten Proteingemisch, in dem ausgewählten Vektor oder in der ausgewählten Zelle enthaltende Protein oder Proteinfragment oder

eine Variante davon mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger und/oder Hilfsstoff gemischt wird.

20. Kit zur Herstellung eines Nukleinsäuregemisches nach Anspruch 10 enthaltend:

5

a) mindestens eine erste Nukleinsäure enthaltend mindestens eine Restriktionsschnittstelle 5' und/oder 3' von einer Nukleinsäure kodierend für ein erstes Fusionsprotein enthaltend:

10

i) eine Interaktionsdomäne und

ii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das erste Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird.

15 21. Kit nach Anspruch 20, desweiteren enthaltend:

a) mindestens eine zweite Nukleinsäure enthaltend mindestens eine Restriktionsschnittstelle 5' und/oder 3' von einer Nukleinsäure kodierend für ein zweites Fusionsprotein enthaltend:

20

i) eine Interaktionsdomäne und

ii) eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das zweite Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird,

25

wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

22. Verwendung einer Zelle nach Anspruch 13 zur Herstellung eines Proteingemisches nach einem der Ansprüche 1-9.

30

23. Verwendung eines Proteingemisches nach einem der Ansprüche 1 bis 9, eines Vektors nach Anspruch 12 und/oder einer Zelle nach Anspruch 13 zur Herstellung einer Bibliothek nach Anspruch 14.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Proteingemisch, enthaltend mindestens ein erstes Fusionsprotein, enthaltend ein Protein oder Proteinfragment, eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in ein Bakterium in einem im wesentlichen ungefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, und mindestens ein zweites Fusionsprotein, enthaltend ein Protein oder Proteinfragment, eine Interaktionsdomäne und eine Proteintranslokationssequenz, die bewirkt, daß das Fusionsprotein bei Expression in einem Bakterium in einem im wesentlichen gefalteten Zustand durch die zytoplasmatische Membran transloziert wird, wobei die Interaktionsdomäne des ersten Fusionsproteins an die des zweiten Fusionsproteins binden kann.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Charité

<120> Gemisch mindestens zweier Fusionsproteine sowie ihre Herstellung und Verwendung

<130> U30038

<160> 4

<170> Word 98, Windows

<210> 1

<211> 4765

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> pCD4/GFP24 Klonierungs- und Expressionsvektor

<400> 1

ctagataaga	aggaagaaaa	ataatgaaca	ataacgatct	ctttcaggca	tcacgtcggc	60
gttttctggc	acaactcggc	ggcttaaccg	tcgccgggat	gctggggccg	tcattgttaa	120
cgccgcgacg	tgcgactgog	gcccagccgg	ccatggcggg	atccgttcaa	ctagcagacc	180
attatcaaca	aaataactcca	attggcgatg	gccctgtcct	tttaccagac	aaccattacc	240
tgtcgacaca	atctgccctt	tcgaaagatc	ccaacgaaaa	gcgtgaccac	atggtccttc	300
ttgagtttgt	aactgctgct	gggatttccg	gtggtggtgg	tgctaccccg	caggacctga	360
acaccatgct	gggtggtggt	ggtagtaaag	gagaagaact	tttcaactgga	gttgtcccaa	420
ttcttggtga	attagatggt	gatgttaatg	ggcacaaaatt	ttctgtcagt	ggagagggtg	480
aaggtgatgc	aacatacggg	aaacttaccc	ttaaattttat	ttgcactact	ggaaaactac	540
ctgttccatg	gccaacactt	gtcactactt	tctcttatgg	tgttcaatgc	ttttcccggt	600
atccggatca	tatgaaacgg	catgactttt	tcaagagtgc	catgcccga	ggttatgtac	660
aggaacgcac	tatatctttc	aaagatgacg	ggaactacaa	gacgcgtgct	gaagtcaagt	720
ttgaagggtg	tacccttggt	aatcgatatc	agttaaaagg	tattgatttt	aaagaagatg	780
gaaacattct	cggacacaaa	ctcgagtaca	actataactc	acacaatgta	tacatcacgg	840
cagacaaaca	aaagaatgga	atcaaagcta	acttcaaaat	tcgccacaac	attgaagatt	900
cggcctcggg	ggccgcagaa	caaaaactca	tctcagaaga	gaatctgtat	ttccaggggc	960
atgcttgccg	tggcaccgac	acootgcaag	ctgaaaccga	ccagctggaa	gacgagaaat	1020
ccgctctgca	gactgaaatc	gctaacctgc	tgaagagaga	agagaaactg	gaattcattc	1080
tggctgctca	cggcggttgt	gggctaggct	aataacttaa	gccaaggagg	aaaataaaat	1140
gaaataccta	ttgcctacgg	cagccgctgg	attgttatta	ctcgcgccac	agccggccat	1200
ggcaagcatc	tgcggtggcc	gtatcgctcg	tctggaagaa	aaagttaaaa	ccctgaaagc	1260
tcagaactcc	gaactggctt	ccacccgcta	catgctgctg	gaacagggtg	ctcagctgaa	1320
gcagaaagtt	atgaaccacg	gcggttgttg	tggcggttcc	ctagcgggct	ccggttccgg	1380
tgattttgat	tatgaaaaaa	tggcaaacgc	taataagggg	gctatgaccg	aaaatgccga	1440
tgaaaaacgc	ctacagtctg	acgctaagg	caaacttgat	tctgtcgcta	ctgattacgg	1500
tgctgctatc	gatggtttca	ttggtgacgt	ttccggcctt	gctaattgga	atggtgctac	1560
tgggtgatttt	gctggctcta	attcccaaat	ggctcaagtc	ggtgacggtg	ataattcacc	1620
tttaatgaat	aatttccgtc	aatattttacc	ttctttgcct	cagtcggttg	aatgtcgccc	1680
ttatgtcttt	ggcgtggtga	aaccatatga	atctttctatt	gattgtgaca	aaataaactt	1740
attccgtggt	gtctttgcgt	ttcttttata	tgttgccacc	tttatgtatg	tattttcgac	1800
gtttgctaac	atactgcgta	ataaggagtc	ttaataagct	tgacctgtga	agtgaanaat	1860
ggcgacacatt	gtgcgacatt	ttttttgtct	gccgtttacc	gctactgcgt	cacggatctc	1920
cacgcgccct	gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	1980
gctacacttg	ccagcgccct	agcgcccgct	cctttcgctt	tcttcccttc	ctttctcgcc	2040
acgttcgccc	gctttccccg	tcaagctcta	aatcgggggc	tcccttttagg	gttccgattt	2100
agtgcctttac	ggcacctoga	ccccaaaaaa	cttgatttagg	gtgatggttc	acgtagtggg	2160
ccatcgccct	gatagacggt	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtccacggt	ctttaatagt	2220
ggactcttgt	tccaaactgg	aacaacactc	aaccctatct	cggctctattc	ttttgattta	2280
taagggatttt	tgccgatttc	ggcctatttg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaattt	2340
aacgcgcgatg	ctaacaaaaa	attaaaaaac	gccggcgccg	aaccgagcgt	taatagttaa	2400

gttaccatca	cggaaaaaag	ttatgctgct	tttaagaccc	actttcacat	ttaagttggt	2460
tttctaatac	gcatatgata	aattcaaggg	cgaataagaa	ggctgggtct	gcaccttggt	2520
gatcaataaa	ttcgatagct	tgtcgtataa	atggcggcat	actatcagta	gtaggtgttt	2580
ccctttcttc	tttagcgact	tgatgctctt	gatcttccaa	tacgcaacct	aaagtaaaaa	2640
gccccactgc	gctgagtgca	tataatgcat	tctctagtga	aaaaccttgt	tggcataaaa	2700
aggctaattg	attttcgaga	gtttcatact	gtttttctgt	aggccgtgta	cctaaatgta	2760
cttttgctcc	atcgcgatga	cttagtaaa	cacatctaaa	acttttagcg	ttattacgta	2820
aaaaatcttg	ccagctttcc	ccttctaaa	ggcaaaagtg	agtatggtgc	ctatctaaca	2880
tctcaatggc	taaggcgctg	agcaaaagccc	gcttattttt	tacatgccaa	tacaatgtag	2940
gctgctctac	acctagcttc	tgggcgagtt	tacgggttgt	taaaccttcg	attccgacct	3000
cattaagcag	ctctaattgc	ctgttaata	ctttactttt	atctaaacga	gacatcatta	3060
attcctatta	cgccccgccc	tgcactcat	cgagtagctg	ttgtaattca	ttaagcattc	3120
tgccgacatg	gaagccatca	caaacggcat	gatgaacctg	aatcgccagc	ggcgtcagca	3180
ccttgctgcc	ttgcgtataa	tatttgccca	tagtgaaaac	gggggcgaag	aagttgtcca	3240
tattggccac	gtttaaatca	aaactggtga	aactcaccga	gggattggct	gagacgaaaa	3300
acatattctc	aataaacctt	ttagggaaat	aggccaggtt	ttcaccgtaa	cagccacat	3360
cttgcgata	tatgtgtaga	aactgcccga	aatcgctctg	gtattcactc	cagagcgatg	3420
aaaacgtttc	agtttgctca	tggaaaacgg	tgtaacaagg	gtgaacacta	tcccatatca	3480
ccagctcacc	gtctttcatt	gccatacggg	attccggatg	agcattcatc	aggcgggcaa	3540
gaatgtgaat	aaaggccgga	taaaacttgt	gcttattttt	ctttacggtc	tttaaaaagg	3600
ccgtaatatc	cagctgaacg	gtctgggtat	aggtagattg	agcaactgac	tgaatgcct	3660
aaaaatgttc	tttacgatgc	cattgggata	tatcaacggg	ggtatatcca	gtgatttttt	3720
tctccatact	cttccctttt	caatattatt	gaagcattta	tcagggttat	tgtctcatga	3780
gcggtatacat	atttgaatgt	atttagaaaa	ataaacaat	agggggtccg	cgacattttc	3840
cccgaataag	gccacctgaa	attgtaagcg	ttactagttt	aaaaggatct	aggtgaagat	3900
cctttttgat	aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	ttttcgttcc	actgagcgtc	3960
agaccccgtg	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	ttttttctgc	gcgtaatctg	4020
ctgcttgcaa	acaaaaaaac	caccgctacc	agcgggtggt	tgtttgccgg	atcaagagct	4080
accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	cagataccaa	atactgtcct	4140
tctagtgtag	ccgtagttag	gccaccactt	gtagcaccgc	ctacatacct		4200
cgctctgcta	atcctgttac	cagtggctgc	tgccagtggc	gataagtcgt	gtcttaccgg	4260
gttggaactca	agacgatagt	taccggataa	ggcgagcg	tcgggctgaa	cgggggggtc	4320
gtgcacacag	cccagcttgg	agcgaacgac	ctacaccgaa	ctgagatacc	tacagcgtga	4380
gctatgagaa	agcgccacgc	ttcccgaagg	gagaaaggcg	gacaggatgc	cggtaagcgg	4440
cagggtcgga	acaggagagc	gcacgaggga	gcttccaggg	ggaaacgcct	ggtatcttta	4500
tagtctctgc	gggtttcgcc	acctctgact	tgagcgtcga	tttttgtgat	gctcgtcagg	4560
ggggcgagc	ctatggaaaa	acgccagcaa	cgcggccttt	ttacggttcc	tggccttttg	4620
ctggcctttt	gctcacatga	ccgacacca	tcgaatggcc	agatgattaa	ttcctaattt	4680
ttgttgacac	tctatcattg	atagagttat	tttaccactc	cctatcagtg	atagagaaaa	4740
gtgaaatgaa	tagttcgaca	aaaaat				4765

<210> 2

<211> 4971

<212> DNA

<213> künstliche Sequenz

<220>

<221> pCA1/GFP24 Klonierungs- und Expressionsvektor

<400> 2

ctagataaga	aggaagaaaa	ataatgaaca	ataacgatct	ctttcaggca	tcacgtcggc	60
gtttttctggc	acaactcggc	ggcttaaccg	tcgccgggat	gctggggccg	tcattgttaa	120
cgccgcgacg	tgcgactgcg	gccagccggg	ccatggcggg	atccgttcaa	ctagcagacc	180
attatcaaca	aaatactcca	attggcgatg	gccctgtcct	tttaccagac	aaccattacc	240
tgtcgacaca	atctgccctt	tcgaaagatc	ccaacgaaaa	gcgtgaccac	atggtccttc	300
ttgagtttgt	aactgctgct	gggatttccg	gtggtgggtg	tgctaccccg	caggacctga	360
acaccatgct	gggtgggtgg	ggtagtaaa	gagaagaact	tttactgga	gttgtcccaa	420
ttcttgttga	attagatggt	gatgttaatg	ggcacaat	ttctgtcagt	ggagagggtg	480
aaggtgatgc	aacatacgga	aaacttacc	ttaaatttat	ttgcactact	ggaaaactac	540
ctgttccatg	gccaacactt	gtcactactt	tctcttatgg	tgttcaatgc	ttttcccggt	600
atccggatca	tatgaaacgg	catgactttt	tcaagagtgc	catgcccgaa	ggttatgtac	660
aggaacgcac	tatatctttc	aaagatgacg	ggaactacaa	gacgcgtgct	gaagtcaagt	720

ttgaaggtga	tacccttggt	aatcgtatcg	agttaaaagg	tattgatttt	aaagaagatg	780
gaaacattct	cggacacaaa	ctcgagtaca	actataactc	acacaaatgta	tacatcacgg	840
cagacaaaca	aaagaatgga	atcaaagcta	acttcaaaat	tcgccacaac	attgaagatt	900
cggcctcggg	ggccgcagaa	caaaaactca	tctcagaaga	gaatctgtat	ttccagggcg	960
ggcccaaaacc	ttccaccccg	cctggttctt	caggcgctcg	cgggtggcctg	accgacaccc	1020
tgcaagctga	aaccgaccag	ctggaagacg	agaaatccgc	tctgcagact	gaaatcgcta	1080
acctgctgaa	agagaaagag	aaactggaat	tcattctggc	tgctcacggc	ggttggtaat	1140
aacttaagcc	aaggaggaaa	ataaaatgaa	atacctattg	cctacggcag	ccgctggatt	1200
gttattactc	gctgccaac	cagcgatggc	cgcacagggt	aaactgctcg	agagcgcttg	1260
cgggtggccgt	atcgctcgct	tggaagaaaa	agttaaaacc	ctgaaagctc	agaactccga	1320
actggcttcc	accgctaaca	tgctgcgtga	acagggttgct	cagctgaagc	agaaagtatt	1380
gaaccacggc	ggttggtgcta	gcgggtggcgg	ctccggttcc	ggtgattttg	attatgaaaa	1440
aatggcaaac	gctaataagg	gggctatgac	cgaaaatgcc	gatgaaaacg	cgctacagtc	1500
tgacgctaaa	ggcaaacctg	attctgtcgc	tactgattac	ggtgctgcta	tcgatgggtt	1560
cattgggtgac	gtttccggcc	ttgctaattg	taatggtgct	actggtgatt	ttgctggctc	1620
taattcccaa	atggctcaag	tcgggtgacgg	tgataattca	cctttaatga	ataatttccg	1680
tcaatatttta	ccttctttgc	ctcagtcggt	tgaatgtcgc	ccttatgtct	ttggcgctgg	1740
taaaccatat	gaattttcta	ttgatttgta	caaaataaac	ttattccgtg	gtgtctttgc	1800
gtttcttttta	tatgttgcca	cctttatgta	tgtattttcg	acgtttgcta	acatactgcg	1860
taataaggag	tcttaataag	ccttgacctg	gaagtgaaaa	atggcgcaca	ttgtgcgaca	1920
ttttttttgt	ctgccgttta	ccgctactgc	gtcacggatc	tccacgcgcc	ctgtagcggc	1980
gcattaagcg	cggcgggtgt	ggtgggttacg	cgcagcgtga	ccgctacact	tgccagcgcc	2040
ctagcgcccg	ctcctttcgc	tttcttccct	tcctttctcg	ccacgttcgc	cggctttccc	2100
cgtcaagctc	taaatcgggg	gctcccttta	gggttccgat	ttagtgtctt	acggcacctc	2160
gaccccaaaa	aacttgatta	gggtgatggt	tcacgtagtg	ggccatcgcc	ctgatagacg	2220
gttttttcg	ccttgacgtt	ggagtcacacg	ttctttaata	gtggactctt	gttccaaact	2280
ggaacaacac	tcaaccctat	ctcggctctat	tcttttgatt	tataagggat	tttgccgatt	2340
tcggcctatt	ggttaaaaaa	tgagctgatt	taacaaaaat	ttaacgcgaa	ttttaacaaa	2400
atattaacgc	ttacaatttc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccttatt	2460
tgttttat	tctaaataca	ttcaaatacg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	2520
atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacattttccg	tgctgcctct	2580
attccctttt	ttgcggcatt	ttgccttctt	gtttttgtct	acccagaaac	gctgggtgaaa	2640
gtaaaagatg	ctgaagatca	ggtgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	2700
agcggtaaga	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcaacttt	2760
aaagtctcgc	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggt	2820
cgccgcatac	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	2880
cttacggatg	gcatgacagt	aagagaatta	tgacgtgctg	ccataaccat	gagtgataac	2940
actgcggcca	acttacttct	gacaacgac	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	3000
cacaacatgg	gggatcatgt	aactcgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	3060
ataccaaacg	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggaacaac	ggttgcgcaa	3120
ctattaactg	gcgaactact	tactctagct	tcgggcaaac	aattgataga	ctggatggag	3180
gcggataaag	ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttatttgt	3240
gataaatctg	gagccgggtg	gcgtggctct	cgoggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	3300
ggtaagccct	ccggtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	3360
cgaaatagac	agatcgctga	gatagggtgc	tcactgatta	agcattggta	ggaattaatg	3420
atgtctcggt	tagataaaaag	taaagtgatt	aacagcgcac	tagagctgct	taatgaggtc	3480
ggaatcgaag	gtttaacaac	ccgtaaaact	gcccagaagc	taggtgtaga	gcagcctaca	3540
ttgtattggc	atgtaaaaaa	taagcgggct	ttgctcgacg	ccttagccat	tgagatgtta	3600
gataggcacc	atactcactt	ttgcccttta	gaaggggaaa	gctggcaaga	ttttttacgt	3660
aataacgcta	aaagttttag	atgtgcttta	ctaagtcac	gcgatggagc	aaaagtacat	3720
ttaggtacac	ggcctacaga	aaaacagtat	gaaactctcg	aaaatcaatt	agccttttta	3780
tgccaacaag	gtttttcact	agagaatgca	ttatatgcac	tcagcgcagt	ggggcatttt	3840
acttttaggt	gcgtattgga	agatcaagag	catcaagtcg	ctaaagaaga	aagggaaaca	3900
cctactactg	atagtattgc	gccattatta	cgacaagcta	tcgaattatt	tgatcaccaa	3960
ggtgcagagc	cagccttctt	attcggcctt	gaattgatca	tatgcggatt	agaaaaacaa	4020
cttaaatgtg	aaagtgggtc	ttaaaagcag	cataaccttt	ttccgtgatg	gtaacttcac	4080
tagtttaaaa	ggatctaggt	gaagatcctt	tttgataatc	tcagtaccaa	aatcccttaa	4140
cgtgagtttt	cgttccactg	agcgtcagac	cccgtagaaa	agatcaaagg	atcttcttga	4200
gatccttttt	ttctgcgcgt	aatctgctgc	ttgcaaaaca	aaaaaccacc	gctaccagcg	4260
gtggtttggt	tgccggatca	agagctacca	actctttttc	cgaaggtaac	tggtctcagc	4320
agagcgcaga	taccaaatac	tgctccttcta	gtgtagccgt	agttaggcca	ccacttcaag	4380
aactctgtag	caccgcctac	atacctcgct	ctgctaattc	tgttaccagt	ggctgctgcc	4440
agtggcgata	agtcgtgtct	taccgggttg	gactcaagac	gatagttacc	ggataaggcg	4500

cagcggtcgg	gctgaacggg	gggttcgtgc	acacagccca	gcttggagcg	aacgacctac	4560
accgaactga	gatacctaca	gcgtgagcta	tgagaaagcg	ccacgcttcc	cgaagggaga	4620
aaggcggaca	ggtatccggt	aagcggcagg	gtcggaaacag	gagagcgcac	gagggagctt	4680
ccagggggaa	acgcctggta	tctttatagt	cctgtcgggt	ttcgccacct	ctgacttgag	4740
cgtcgatttt	tgtgatgctc	gtcagggggg	cggagcctat	ggaaaaacgc	cagcaacgcg	4800
gcctttttac	ggttcctggc	cttttgctgg	ccttttgctc	acatgaccgc	acaccatcga	4860
atggccagat	gattaattcc	taatttttgt	tgacactcta	tcattgatag	agttatttta	4920
ccactcccta	tcagtgatag	agaaaagtga	aatgaatagt	tcgacaaaaa	t	4971

<210> 3
 <211> 4765
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> pCN1/GFP24 Klonierungs- und Expressionsvektor

<400> 3

ctagataaga	aggaagaaaa	ataatgaaca	ataacgatct	ctttcaggca	tcacgtcggc	60
gtttttctggc	acaactcggc	ggcttaaccg	tcgcggggat	gctggggccg	tcattgttaa	120
cgccgcgacg	tgcgactgcy	gccagccgg	ccatggcggg	atccgttcaa	ctagcagacc	180
attatcaaca	aaataactcca	attggcgatg	gccctgtcct	tttaccagac	aaccattacc	240
tgctcgacaca	atctgccctt	tcgaaagatc	ccaacgaaaa	gcgtgaccac	atggtccttc	300
ttgagtttgt	aactgctgct	gggatttccg	gtggtgggtg	tgctaccccg	caggacctga	360
acaccatgct	gggtgggtgg	ggtagtaaa	gagaagaact	tttcaactgga	gttgtcccaa	420
ttcttggtga	attagatggg	gatgttaatg	ggcacaaaat	ttctgtcagt	ggagagggtg	480
aaggtgatgc	aacatacggg	aaacttacc	ttaaatttat	ttgcactact	ggaaaaactac	540
ctgttccatg	gccaacactt	gtcactactt	tctcttatgg	tgttcaatgc	ttttcccggt	600
atccggatca	tatgaaacgg	catgactttt	tcaagagtgc	catgcccga	ggttatgtac	660
aggaacgcac	tatatctttc	aaagatgacg	ggaactacaa	gacgcgtgct	gaagtcaagt	720
ttgaaggtga	tacccttggt	aatcgatatc	agttaaaagg	tattgatttt	aaagaagatg	780
gaaacattct	cggacacaaa	ctcgagtaca	actataactc	acacaatgta	tacattacgg	840
cagacaaaaca	aaagaatgga	atcaaagcta	acttcaaaat	tcgccacaac	attgaagatt	900
cggcctcggg	ggccgcagaa	caaaaactca	tctcagaaga	gaatctgtat	ttccaggggcg	960
atgcttgccg	tggcaccgac	accctgcaag	ctgaaaccga	ccagctggaa	gacgagaaat	1020
ccgctctgca	gactgaaatc	gctaacctgc	tgaaagagaa	agagaaaactg	gaattcattc	1080
tggctgctca	cggcggttgt	gggctaggct	aataacttaa	gccaaggagg	aaaataaaat	1140
gaaataccta	ttgcctacgg	cagccgctgg	attgttatta	ctcgcggcac	agccggccat	1200
ggcaagcatc	tgccgtggcc	gtatcgctcg	tctggaagaa	aaagttaaaa	ccctgaaagc	1260
tcagaactcc	gaactggctt	ccaccgctaa	catgctcgct	gaacagggtg	ctcagctgaa	1320
gcagaaagtt	atgaaccacg	gcgggttgtg	tgccggttcc	ctagcgggct	ccggttccgg	1380
tgattttgat	tatgaaaaaa	tggaacacgc	taataagggg	gctatgaccg	aaaatgccga	1440
tgaaaacgcg	ctacagtctg	acgctaaaag	caaacttgat	tctgtcgcta	ctgattacgg	1500
tgctgctatc	gatggtttca	ttggtgacgt	ttccggcctt	gctaattggt	atggtgctac	1560
tggtgatttt	gctggctcta	attcccaaat	ggctcaagtc	ggtgacgggt	ataattcacc	1620
tttaatgaat	aatttccgtc	aataatttacc	ttctttgcct	cagtcgggtg	aatgtcgccc	1680
ttatgtcttt	ggcgctggta	aaccatatga	attttctatt	gattgtgaca	aaataaactt	1740
attccgtggg	gtctttgcgt	ttcttttata	tgttgccacc	tttatgtatg	tattttcgac	1800
gtttgctaac	atactgcgta	ataaggagtc	ttaataagct	tgacctgtga	agtgaataat	1860
ggcgccacatt	gtgcgacatt	ttttttgtct	gccgtttacc	gctactgcgt	cacggatctc	1920
cacgcgccct	gtagcggcgc	attaagcgcg	gcgggtgtgg	tggttacgcg	cagcgtgacc	1980
gctacacttg	ccagcgccct	agcgcccgtc	cctttcgctt	tcttcccttc	ctttctcgcc	2040
acgttcgcgg	gctttccccg	tcaagctcta	aatcgggggc	tccttttagg	gttccgattt	2100
agtgcctttac	ggcacctcga	ccccaaaaaa	ccttgattagg	gtgatgggtc	acgtagtggg	2160
ccatcgccct	gatagacggg	ttttcgccct	ttgacgttgg	agtcacacgt	ctttaatagt	2220
ggactcttgt	tccaaacttg	aacaacactc	aacctatatc	cgggtctatc	ttttgattta	2280
taagggattt	tgccgatttc	ggcctattgg	ttaaaaaatg	agctgattta	acaaaaat	2340
aacgcgcgat	caacgccttac	aatttcagggt	ggcacttttc	ggggaaatgt	gcgcggaacc	2400
cctattttgt	tatttttcta	aatacattca	aatatgtatc	cgctcatgag	acaataaccc	2460
tgataaatgc	ttcaataata	ttgaaaaagg	aagagtatgg	agaaaaaaat	cactggatat	2520
accaccggtg	atatatccca	atggcatcgt	aaagaacatt	ttgaggcatt	tcagtcagtt	2580

```

gctcaatgta cctataacca gaccgttcag ctggatatta cggccttttt aaagaccgta 2640
aagaaaaata agcacaagtt ttatccggcc ttatttcaca ttcttgcccg cctgatgaat 2700
gctcatccgg aattccggtat ggcaatgaaa gacgggtgagc tgggtgatatg ggatagtggt 2760
cacccttggt acaccgtttt ccatgagcaa actgaaaacgt ttcatcgct ctggagtga 2820
taccacgacg atttccggca gtttctacac atatattcgc aagatgtggc gtgttacgg 2880
gaaaacctgg cctatttccc taaagggttt attgagaata tgtttttcgt ctcagccaat 2940
ccctgggtga gtttcaccag ttttgattta aacgtggcca atatggaca cttcttcgcc 3000
cccgttttca ctatgggcaa atattatacg caaggcgaca aggtgctgat gccgctggcg 3060
attcaggttc atcatgccgt ttgtgatggc ttccatgtcg gcagaatgct taatgaatta 3120
caacagtact gcgatgagtg gcagggcggg gcgtaatagg aattaatgat gtctcgttta 3180
gataaaagta aagtgattaa cagcgcatca gagctgctta atgaggtcgg aatcgaagg 3240
ttaacaaccc gtaaaactcg ccagaagcta ggtgtagagc agcctacatt gtattggcat 3300
gtaaaaaata agcgggcttt gctcgacgcc tttagccattg agatgttaga taggcacat 3360
actcactttt gcccttttag aggggaaagc tggcaagatt ttttacgtaa taacgctaa 3420
agttttagat gtgctttact aagtcacgc gatggagcaa aagtacattt aggtacacgg 3480
cctacagaaa aacagtatga aactctcgaa aatcaattag cctttttatg ccaacaagg 3540
ttttcactag agaatgcatt atatgcactc agcgcagtgg gccattttac tttaggttgc 3600
gtattggaag atcaagagca tcaagtcgt aaagaagaaa gggaaacacc tactactgat 3660
agtatgccgc cattattacg acaagctatc gaattatttg atcaccaagg tgcagagcca 3720
gccttcttat tcggccttga attgatcata tgcggattag aaaaacaact taaatgtgaa 3780
agtgggtcctt aaaagcagca taaccttttt cctgatgggt aacttacta ttaacgctcg 3840
gttgccgcgg ggcgtttttt aatattttgt taactagttt aaaaggatct aggtgaagat 3900
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcggtcc actgagcgtc 3960
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg 4020
ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt tgtttgccgg atcaagagct 4080
accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 4140
tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 4200
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 4260
gttggaactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cggggggttc 4320
gtgcacacag ccagccttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 4380
gctatgagaa agcggccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaacgg 4440
cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggatcttta 4500
tagtctgtgc ggggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 4560
ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 4620
ctggcctttt gctcacatga cccgacacca tcgaatggcc agatgattaa ttcctaattt 4680
ttgttgacac tctatcattg atagagttat tttaccactc cctatcagtg atagagaaaa 4740
gtgaaatgaa tagttcgaca aaaat

```

4765

<210> 4
 <211> 823
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<220>
 <221> reife TEM-1 β -Lactamase Klonierungskassette
 <400> 4

```

ggcccagccg gccatggctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca 60
gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag 120
ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcg 280
ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac actatttctca 240
gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt 300
aagagaatta tgcagtgtcg ccataaccat gagtgataac actgcggcca acttacttct 360
gacaacgata ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt 420
aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga 480
caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac ctatgcgaaa ctattaactg gcgaactact 540
tactctagct tcccggcaac aattgataga ttggatggag gcggataaag ttgcaggacc 600
acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggtga 660
gcgtggctct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt 720
agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga 780

```

gataggtgcc tcaactgatta agcattggtc ggctcgggg gcc

823

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.